

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DALVA TERESINHA DE SOUZA ZARDO MIRANDA



O ÓLEO DE PEIXE SUPLEMENTADO NA DIETA DE RATOS ASMÁTICOS TEM  
AÇÃO LIMITADA NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS E NA  
MODULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEUCOTRIENO B<sub>4</sub>

CURITIBA

2014

DALVA TERESINHA DE SOUZA ZARDO MIRANDA

O ÓLEO DE PEIXE SUPLEMENTADO NA DIETA DE RATOS ASMÁTICOS TEM  
AÇÃO LIMITADA NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS E NA  
MODULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEUCOTRIENO B<sub>4</sub>

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Aníta Nishiyama

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Miranda, Dalva Teresinha de Souza Zardo

O óleo de peixe suplementado na dieta de ratos asmáticos tem ação limitada na contração do músculo liso das vias aéreas e na modulação da concentração de leucotrieno B4. / Dalva Teresinha de Souza Zardo Miranda. – Curitiba, 2014.

101 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anita Nishiyama

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Óleo de peixe 2. Asma I. Título II. Nishiyama, Anita III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 574.87


## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)


### PARECER


A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Profa. Dra. Anita Nishiyama**  
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero**  
Universidade de São Paulo - USP

  
**Prof. Dr. Juliano Bordignon**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

  
**Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort-Santos**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Profa. Dra. Juliana Bello Baron-Maurer**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR.

E tendo como suplentes,


**Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

**Prof. Dr. Pedro Michelotto**  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Após arguir a candidata **Daiva Teresinha de Souza Zardo Miranda**, em relação ao seu trabalho intitulado: "O óleo de peixe suplementado na dieta de ratos asmáticos tem ação limitada na contração do músculo liso das vias aéreas e na modulação da concentração de Leucotrieno B<sub>4</sub>", são de parecer favorável à aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2014

  
Prof. Dr. Edvaldo de Jesus Trindade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família o amor e apoio incondicional. Às minhas filhas, Cecília e Lígia, que são maravilhosas e todos os dias me trazem alegria, felicidade e força. Ao meu marido Armando, também maravilhoso, meu companheiro para tudo, que me compreende, me incentiva e acredita em mim. Aos meus pais, Therezinha e Ricardo que sempre estiveram ao meu lado, nessa e em muitas outras jornadas. Agradeço a Irene, Cardo, Flavia, Zeza, Armando Higino, tio João Pedro, tia Amélia e tia Tana, vó Afra, e a toda a grande família que tenho hoje, todo carinho e incentivo durante esses anos todos. O mérito de minhas conquistas é também de cada um de vocês.

Agradeço à professora Anita Nishiyama a orientação, os ensinamentos, a espontaneidade, a honestidade e a amizade. Muito obrigada pela oportunidade de fazer o doutorado, pela confiança que sempre teve em mim e pela força que sempre me deu em todos os momentos em que precisei.

Agradeço aos amigos Ana Lucia Zanatta, Bruna Carolina Lui Dias, Rodrigo Martinez de Campos, Mariana da Costa Massaro, Vanessa Rodrigues de Souza, Patrícia Heidnisch Machado e Hannah Vialich, toda sua excelente contribuição e empenho para a realização dos procedimentos experimentais desse trabalho. Também agradeço ao Fabrício Furtado Vieira e ao Robson Olivottoa ajuda com os experimentos no Laboratório de Contração Muscular, aos técnicos Herculano S. Reis Filho (Seu Nino), do Laboratório de Histotecnologia, Israel H. Bini e Alessandra C.S. dos Santos a colaboração para confecção do material para análise histológica e aos funcionários do Biotério da UFPR.

Agradeço ao Professor Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça a gentileza de permitir a utilização do Laboratório de Contração Muscular e de seus equipamentos e à Professora Dra. Juliana Bello Baron Maurer a doação de kits para dosagem de citocinas, bem como a permissão para utilizar seu laboratório e seus equipamentos.

Agradeço à Professora Dra. Lucélia Donatti que tornou possível a execução das análises histológicas e ao Professor Dr. Philip C. Calder, que disponibilizou os kits para dosagem dos eicosanoides, além de me receber em seu laboratório e custear minha estadia em Southampton para realização dos experimentos.

Agradeço à Dra. Elizabeth Miles o acompanhamento dos ensaios realizados na University of Southampton e à Annette West a execução das análises de ácidos graxos. Todas essas parcerias foram fundamentais para realização dessa tese.

Agradeço ao Professor Dr. Luiz Claudio Fernandes o compartilhamento do espaço físico e do material do Laboratório de Metabolismo Celular.

Agradeço aos colegas Júlia Aikawa, Adriana Yamaguchi, Danielle Pequito, Isabela Coelho, Gina Borghetti, Gleisson Brito, Raciele, Ricardo Tanhoffer, Aldre Tanhoffer e Sergio, do Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR, a ajuda, a presteza e a companhia de todos os dias.

Agradeço ao coordenador Edvaldo da Silva Trindade e aos demais professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular o apoio e incentivo. Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Departamento de Fisiologia a disposição em colaborar com empréstimo de material ou laboratório, dedicação de tempo, acompanhamento de atividades do REUNI, e outras pequenas ajudas e atitudes que fizeram para mim uma grande diferença, em especial a Marlene (secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular) e o Fábio (técnico do Laboratório Central de Fisiologia).

Agradeço aos Professores que participaram dos eventos dos Doutorandos a avaliação do projeto, dos relatórios e da apresentação de painéis: Anete Curte Ferraz, Juliano Bordignon, Anderson Joel Martino Andrade e Carolina Camargo de Oliveira.

Agradeço à CAPES o auxílio financeiro para realização do doutorado e à Herbarium a disponibilização das cápsulas de óleo de peixe para suplementação dos animais do estudo.

Agradeço aos Professores Doutores, membros da Banca Examinadora, Marcelo Macedo Rogero, Juliano Bordignon, Almeriane Maria Weffort-Santos e Juliana Bello Baron Maurer o compartilhamento de seus conhecimentos, durante a defesa do doutorado, mas também durante os 4 anos de doutorado em que me avaliaram ou acompanharam meu trabalho, e a colaboração para o aprimoramento dessa tese, e aos Professores Doutores, membros suplentes da banca, Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça e Pedro Vicente Michelotto Júnior.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os efeitos anti-inflamatórios da suplementação com óleo de peixe resultam principalmente da incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 nas membranas celulares e consequente modulação da produção de eicosanoides e citocinas inflamatórias. Entretanto, sua eficácia na asma tem se mostrado inconsistente e poucos estudos foram realizados sobre sua ação na funcionalidade do músculo liso das vias aéreas, o que é determinante para a asma. **Objetivo:** avaliar os efeitos da suplementação de ratos asmáticos com óleo de peixe sobre a funcionalidade do músculo liso das vias aéreas (MLA) e a complacência pulmonar estática, bem como sobre os parâmetros inflamatórios relacionados com a hiper-responsividade e a obstrução das vias aéreas. **Metodologia:** Ratos Wistar foram separados em 4 grupos: controle (C); suplementado com óleo de peixe (OP); asmático (A), e asmático suplementado com óleo de peixe (AOP). Os grupos OP e AOP foram suplementados com 1 g de óleo de peixe/ kg de massa corpórea por 21 dias e os grupos A e AOP foram induzidos à asma com ovalbumina. A contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) e a capacidade fagocitária e de adesão dos macrófagos alveolares foram avaliadas, vinte e quatro horas após o último desafio com ovalbumina; o músculo liso obtido de um anel de traqueia foi isolado e a força de contração e o relaxamento foram avaliados; a complacência pulmonar estática foi avaliada utilizando-se um transdutor de pressão; as concentrações pulmonares de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), 8-isoprostano prostaglandina F<sub>2</sub> (8-Iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) e lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) foram avaliadas por sistemas comerciais de *kits* de imuno-ensaio enzimático; o perfil de ácidos graxos (AG) no tecido pulmonar foi avaliado por cromatografia gasosa e a análise da espessura da parede das vias aéreas e do muco foram realizadas por morfometria dos bronquíolos. Para análise estatística foi utilizada ANOVA com pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas para p<0,05. **Resultados:** a suplementação com óleo de peixe nos animais asmáticos suprimiu a infiltração de leucócitos para os pulmões, reduziu a capacidade fagocitária de macrófagos alveolares e aumentou a complacência pulmonar estática; reduziu as concentrações pulmonares de tromboxanos B<sub>2</sub>, isoprostanos PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e prostaglandinas E<sub>2</sub>, mas não teve efeitos sobre as concentrações de leucotrienos B<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e sobre a eosinofilia, que são fatores que afetam a funcionalidade do músculo liso das vias aéreas e a hiper-responsividade brônquica. **Conclusão:** a eficácia da suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos pode ser limitada por uma ação ineficiente sobre a contração do MLA, o que pode ser decorrente da falta de efeito na modulação que o óleo de peixe exerce sobre as concentrações de leucotrieno B<sub>4</sub> na asma, ou ainda, à resistência do MLA aos efeitos dos AGPI n-3.

Palavras-chave: óleo de peixe; ácidos graxos n-3; asma; músculo liso das vias aéreas; complacência pulmonar; eicosanoides; citocinas.

## ABSTRACT

The anti-inflammatory effects of supplementation with fish oil mainly result from the incorporation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-3 in cell membranes and consequent modulation of eicosanoid production and inflammatory cytokines. However, its efficacy in asthma has been shown to be inconsistent and few studies have been conducted on its effect on functionality of airway smooth muscle (ASM), which is crucial for asthma. **Objective:** To evaluate the effects of dietary supplementation of asthmatic rats with fish oil on the functionality of ASM and static pulmonary compliance, as well as on inflammatory parameters related to hyper-responsiveness and airway obstruction. **Material and Methods:** Wistar rats were divided into 4 groups: control (C), supplemented with fish oil (OP), asthma (A) and asthmatic supplemented with fish oil (AOP). AOP and OP groups were supplemented with 1 g fish oil / kg body mass for 21 days and the groups A and AOP were asthma-induced with ovalbumin. Twenty-four hours after the last ovalbumin challenge, the total and differential cell count of broncho-alveolar lavage (BAL) and the phagocytic and adhesion capacity of alveolar macrophages were evaluated; smooth muscle obtained from a ring of trachea was isolated and the force of contraction and the relaxation were assessed; static pulmonary compliance was measured using a pressure transducer; lung concentrations of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), F<sub>2</sub> isoprostane (8-Iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) and lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) were evaluated by enzymatic immunoassays; Lung fatty acids (FA) profile was assessed by gas chromatography; the analysis of airway wall thickness and the amount of the mucus were performed by bronchial morphometry. Statistical analysis was performed using ANOVA with Tukey post-test and differences were considered significant for p<0.05. **Results:** Supplementation of asthmatic animals with fish oil suppressed cell infiltration into the lungs, reduced the phagocytic capacity of alveolar macrophages and increased static lung compliance; reduced lung concentrations of thromboxane B<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> isoprostanes and prostaglandin E<sub>2</sub>, but had no effect on the levels of leukotriene B<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and on eosinophilia, which are factors affecting the functionality of the airway smooth muscle and hyper-responsiveness. **Conclusion:** The effectiveness of fish oil supplementation in asthmatic rats can be limited by an inefficient action on ASM force of contraction, which may relate to the lack of effect upon the modulation of leukotrienes B<sub>4</sub> by fish oil in asthma, or to the resistance of ASM to n-3 PUFA effects.

Key-words: fish oil, n-3 fatty acids; asthma, airway smooth muscle; lung compliance; eicosanoids; cytokines.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural condensada plana dos ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) e o código numérico que representa a estrutura .....	20
Figura 2 - Fórmula estrutural condensada plana do ácido araquidônico (AA) e o código numérico que representa a estrutura .....	21
Figura 3 - Visão geral da conversão de ácido araquidônico em eicosanoides .....	23
Figura 4 - Visão geral da síntese de mediadores lipídicos a partir do ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) e seus efeitos na inflamação.....	24
Figura 5 - Esquema da apresentação de antígeno com ativação de células T helper progenitoras (Thp), preferencialmente em células T helper 2 (Th <sub>2</sub> ) do que T helper 1 (Th <sub>1</sub> ), e citocinas envolvidas .....	29
Figura 6 - Estrutura da Prostaglandina F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> ) (a) e de seu isômero, gerado por peroxidação lipídica, 8-Isoprostano F <sub>2α</sub> (8-Iso-PGF <sub>2α</sub> ) (b) .....	34
Figura 7 - Biossíntese da lipoxina nas vias aéreas .....	34
Figura 8 - Representação esquemática da contração do músculo liso das via aéreas induzida por agonistas .....	37
Figura 9 - Representação esquemática do relaxamento do músculo liso das via aéreas induzida por isoproterenol .....	38
Figura 10 - Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo C .....	58
Figura 11 - Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo OP .....	58
Figura 12 - Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo A .....	59
Figura 13 - Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo AOP .....	59
Figura 14 - Capacidade de adesão de macrófagos de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe.....	60
Figura 15 - Capacidade fagocitária de macrófagos de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	61

Figura 16 - Força de contração (8A) e relaxamento (8B) do músculo liso das vias respiratórias de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	62
Figura 17 - Complacência pulmonar estática em ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	63
Figura 18 - Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados de uma das lâminas do grupo C .....	65
Figura 19 - Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados de uma das lâminas do grupo OP .....	65
Figura 20 - Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados de uma das lâminas do grupo A .....	66
Figura 21 - Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados de uma das lâminas do grupo AOP .....	66
Figura 22 - Concentração de TNF- $\alpha$ em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	67
Figura 23 - Concentração de IL-1 $\beta$ em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	68
Figura 24 - Concentração de PGE <sub>2</sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	69
Figura 25 - Concentração de TXB <sub>2</sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	69
Figura 26 - Concentração de LTB <sub>4</sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	70
Figura 27 - Concentração de 8-Iso PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	71
Figura 28 - Concentração de LXA <sub>4</sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	72
Figura 29 - Concentração de RvE <sub>1</sub> em tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número absoluto e relativo de células no LBA de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe .....	56
Tabela 2 – Análise morfométrica histológica do tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe .....	64
Tabela 3 – Porcentagem de ácidos graxos dos lipídios totais do pulmão de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe obtidas por cromatografia gasosa .....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Representação do período experimental, com a indicação dos procedimentos realizados a cada dia, de suplementação, sensibilização à ovalbumina (OVA) e desafio alergênico pulmonar .....	45
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

8-Iso PGF<sub>2α</sub> = 8-isoprostano Prostaglandina F<sub>2α</sub>

A = Grupo asmático

AA = Ácido araquidônico

Ach = Acetilcolina

Ae = Área externadas vias aéreas

AG = Ácidos graxos

AGPI = Ácidos graxos poli-insaturados

Ai = Área internadas vias aéreas

Ai\* = Área luminal ideal

Ame = Área muscular externadas vias aéreas

ANOVA = *Analyses of variance* (Análise de variância)

AOP = Grupo asmático suplementado com óleo de peixe

AR = *Adreno-receptor* (Receptor adrenérgico)

ASM = *Airway smooth muscle*

BAL = *Broncho-alveolar lavage*

BHT = *Butylated hydroxytoluene* (Hidróxido de tolueno butilato)

BR = Bradicinina

C = Grupo controle

C[st] = Complacência pulmonar estática

cAMP = Adenosina monofosfato cíclico

COX = Ciclo-oxigenase

DHA = *Docosapentaenoic acid* (ácido docosahexaenoico)

DP = Variação de pressão

DPA = *Docosahexaenoic acid* (ácido docosapentaenoico)

DV = Variação de volume

EDTA = *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EIA = *Enzyme immune assay* (ensaio imuno-enzimático)

ELISA = *Enzyme linked immuno sorbant assay*

EMAG = Ésteres metílicos de ácidos graxos

EPA = *Eicosapentaenoic acid* (ácido eicosapentaenoico)

EPM = Erro Padrão da Média

FA = *Fatty acids*

GM-CSF = *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*

HE = Hematoxilina/Eosina

HPETE = *Hydroperoxyeicosatetraenoic acid* (ácido hidroperoxieicosatetraenoico)

IgE = Imunoglobulina E

IL = Interleucina

IL-1 $\beta$  = Interleucina 1-beta

IP<sub>3</sub> = Trifosfato de inositol

Iso = Isoproterenol

LBA = Lavado Broncoalveolar

LOX = Lipo-oxigenase

LT = Leucotrienos

LTA<sub>4</sub> = Leucotrieno A<sub>4</sub>

LTB<sub>4</sub> = Leucotrieno B<sub>4</sub>

LTC<sub>4</sub> = Leucotrieno C<sub>4</sub>

LTD<sub>4</sub> = Leucotrieno D<sub>4</sub>

LTE<sub>4</sub> = Leucotrieno E<sub>4</sub>

LXA<sub>4</sub> = Lipoxina A<sub>4</sub>

MCPs1-3 = *Monocyte Chemotatic Proteins 1-3*

MDC = *Macrophage-Derived Chemokine*

MLA = Músculo liso das vias aéreas

MLC = *Miosin Light Chain* (cadeia leve da miosina)

MLCK = *Miosin Light Chain kinase* (cadeia leve da miosina quinase)

NF $\kappa$ B = *Nuclear Factor Kappa B* (Fator Nuclear Kappa B)

NKA = Neurocinina A

OP = Grupo suplementado com óleo de peixe

OVA = Ovalbumina

PBS = *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

Pe = Perímetro externo das vias aéreas

PG = Prostaglandinas

PGD<sub>2</sub> = Prostaglandina D<sub>2</sub>

PGDS = Prostaglandina D Sintase

PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGES = Prostaglandina E Sintase

PGF<sub>2α</sub> = Prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGH<sub>2</sub> = Prostaglandina H<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> = Prostaglandina I<sub>2</sub> ou prostaciclina

Pi = Perímetro interno das vias aéreas

PKA = Proteína quinase A

PLC = Fosfolipase C

Pme = Perímetro muscular externo das vias aéreas

PUFA = *Polyunsaturated fatty acids*

RANTES = *Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*

RvE<sub>1</sub> = Resolvina E<sub>1</sub>

TARC = *Thymus and Activation-Regulated Chemokine*

Th = T *helper*

TNF-α = *Tumor Necrosis Factor-α* (Fator de Necrose Tumoral-α)

TXA<sub>2</sub> = Tromboxano A<sub>2</sub>

TXB<sub>2</sub> = Tromboxano B<sub>2</sub>

WAI = Área interna da parede

WAO = Área da parede adventícia

WAT = Área total da parede

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	19
1.1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1 EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE PEIXE .....	20
2.2 ASMA .....	26
2.2.1 Patogenia da asma alérgica.....	27
2.2.2 Mediadores da inflamação asmática.....	31
2.2.2.1 Mediadores proteicos .....	31
2.2.2.2 Mediadores lipídicos .....	32
2.2.3 Hiper-responsividade do músculo liso das vias aéreas e mediadores inflamatórios.....	35
2.2.4 Alterações na parede das vias aéreas em asmáticos e na complacência pulmonar .....	40
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1 ANIMAIS.....	43
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	43
3.3 SUPLEMENTAÇÃO .....	44
3.4 INDUÇÃO DE UM QUADRO INFLAMATÓRIO PULMONAR SEMELHANTE AO DA ASMA EM ANIMAIS INICIALMENTE SADIOS .....	44
3.4.1 Sensibilização à ovalbumina (OVA).....	45
3.4.2 Desafio alérgico pulmonar com OVA.....	45
3.5 COLETA DO LBA E CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS ...	46
3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO E FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM MICROPLACAS .....	47
3.6.1 Isolamento dos macrófagos alveolares.....	47
3.6.2 Determinação da capacidade de adesão de macrófagos aderidos à microplaca pela coloração com Giemsa .....	47
3.6.3 Determinação da capacidade fagocitária de macrófagos alveolares.....	48
3.7 DETERMINAÇÃO DA RESPONSABILIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL A ACETILCOLINA E ISOPROTERENOL .....	48



3.8 DETERMINAÇÃO DA COMPLACÊNCIA PULMONAR ESTÁTICA.....	49
3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS DIMENSÕES DA PAREDE E DA OBLITERAÇÃO DAS VIAS AÉREAS .....	49
3.10 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF- $\alpha$ E IL-1 $\beta$ NO TECIDO PULMONAR .....	50
3.11 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE EICOSANOIDES NO TECIDO PULMONAR .....	52
3.12 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO PULMONAR	53
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
4.1 NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LBA.....	56
4.2 CAPACIDADE DE ADESÃO E CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES .....	60
4.3 RESPONSIVIDADE DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS.....	61
4.4 COMPLACÊNCIA PULMONAR ESTÁTICA.....	62
4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS BRONQUÍOLOS E MUCO.....	63
4.6 CONCENTRAÇÕES DE TNF- $\alpha$ E IL-1 $\beta$ NO TECIDO PULMONAR .....	67
4.7 CONCENTRAÇÃO DE EICOSANOIDES NOS PULMÕES .....	68
4.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO PULMONAR .....	72
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL .....	101

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos anti-inflamatórios da suplementação com óleo de peixe têm sido amplamente estudados. No óleo de peixe, encontram-se quantidades substanciais de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3), representados pelo ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA). Esses AGPI são incorporados nas membranas celulares de leucócitos, o que resulta na produção de eicosanoides anti-inflamatórios derivados do EPA e DHA, os quais têm menor potencial inflamatório ou podem participar da resolução da inflamação. Além disso, a incorporação desses ácidos graxos acontece às custas do ácido araquidônico (AA) (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009; CALDER, 2009; CALDER, 2010a; MILES, CALDER, 2012), que é o ácido graxo mais comumente encontrado nas membranas das células inflamatórias. Nos processos inflamatórios como a asma, o AA serve como substrato para a geração de eicosanoides que participam da infiltração de leucócitos nos pulmões, produção de muco nas vias aéreas, edema, contração da musculatura lisa brônquica e hiper-responsividade brônquica.

Além da incorporação nas membranas celulares e modulação da disponibilidade de substratos para conversão em eicosanoides bioativos, estudos recentes sugerem que os ácidos graxos n-3 exercem efeitos anti-inflamatórios, prevenindo a ativação de fatores de transcrição como o Fator Nuclear Kappa B (*Nuclear Factor Kappa B* - NFκB), a qual ocorre em resposta a estímulos inflamatórios (CALDER, 2012a). Esse fator de transcrição está envolvido na indução da expressão de genes que codificam uma variedade de proteínas envolvidas na inflamação, como por exemplo citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e enzimas das vias de produção de eicosanoides inflamatórios. Assim, a redução da ativação do NFκB pode ser também um mecanismo pelo qual o EPA e DHA reduzem a quimiotaxia, a produção de citocinas inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão em leucócitos (CALDER, 2012b; CALDER, 2013). Como resultado dessas ações anti-inflamatórias, o óleo de peixe tem sido utilizado em doenças como a artrite reumatóide, a doença de Crohn e a psoríase (CALDER, 2006; CALDER, 2010a). Nesses casos, os estudos demonstram que a suplementação com óleo de peixe pode ser fornecida para diminuir a resposta

inflamatória característica, evidenciando efeitos clínicos benéficos. Entretanto, a eficácia da suplementação com óleo de peixe na asma tem se mostrado inconsistente (THIEN *et al*, 2002; CALDER, 2006). Apesar de alguns estudos demonstrarem que o óleo de peixe reduz a produção de mediadores inflamatórios lipídicos e a quimiotaxia de leucócitos em asmáticos (ARM *et al*, 1988, MICKLEBOROUGH *et al*, 2006), os dados clínicos relativos ao efeito da suplementação com óleo de peixe na asma têm sido equivocados e existem poucas evidências que apoiam a recomendação de tal suplementação para auxiliar o controle da asma (WOODS *et al*, 2004; YIN *et al*, 2009).

A asma é uma doença alérgica caracterizada pela hiper-responsividade das vias aéreas, bronco-constrição, secreção de muco e eosinofilia (UMETSU *et al*, 2002; DOUGHERTY; FAHY, 2009; BLACK *et al*, 2012). Em contato com o alérgeno, o indivíduo asmático apresenta uma reação imediata de bronco-constrição e a liberação concomitante de mediadores inflamatórios. Uma obstrução do fluxo de ar é estabelecida como resultado da contração concêntrica do músculo liso das vias aéreas, do edema e da obstrução luminal por muco (DOUGHERTY; FAHY, 2009).

A hiper-responsividade e a constrição brônquica observadas na asma dependem essencialmente da funcionalidade do músculo liso das vias aéreas (BLACK *et al*, 2012). As propriedades contráteis são moduladas pelos mediadores inflamatórios secretados tanto pelos leucócitos quanto pelo músculo liso das vias aéreas. Entre esses estão a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citocinas presentes em altas concentrações na asma, e os eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA), tais como os leucotrienos da série 4, os tromboxanos, as prostaglandinas e os isoprostanos da série 2. A ação desses mediadores sobre o músculo liso afeta a hiper-responsividade brônquica, que é a principal característica clinicamente relevante e que define a asma (RUBIN *et al*, 1987; SOLWAY; FREDBERG, 1997; NOBLE *et al*, 2012; PASCOE *et al*, 2012) e, portanto, é um foco importante no seu tratamento (BARNES, 2011).

Os medicamentos clinicamente disponíveis e atualmente considerados os mais efetivos para o controle da asma atuam modulando a produção e a ação dos mediadores inflamatórios com papel na contração do músculo liso das vias aéreas (RAMSAY *et al*, 2009; OKUNISHI; PETERS-GOLDEN, 2011). Os medicamentos considerados de primeira-linha no tratamento da asma são os glicocorticóides

(CHANEZ *et al*, 2007). Mesmo assim, o tratamento é limitado, pois a via de produção dos leucotrienos é relativamente resistente aos corticoides (GYLLFORS *et al* 2006; OKUNISHI; PETERS-GOLDEN, 2011). Entre os mediadores inflamatórios, os leucotrienos são os que apresentam ação mais potente sobre a contração do músculo liso das vias aéreas (LEVY, 2005; JAMES *et al*, 2007; FOSTER *et al*, 2013; MONTUSCHI; PETERS-GOLDEN, 2010; BARNES, 2011; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010; SINGH *et al*, 2010; OKUNISHI; PETERS-GOLDEN, 2011; YAN *et al*, 2011), e portanto, os antagonistas dos receptores de leucotrienos e os inibidores de enzimas das vias de produção de leucotrienos também têm sido utilizados para o tratamento da asma, em associação aos glicocorticoides (CHANEZ *et al*, 2007), mas também apresentam limitações (MONTUSCHI *et al* 1999; STANKOVA *et al*, 2002; KHARITONOV *et al*, 2002; BARALDI *et al*, 2003; GYLLFORS *et al*, 2006; NEGRI *et al*, 2008; HOLGATE, 2010; OKUNISHI, PETERS-GOLDEN, 2011). Devido ao seu potencial efeito sobre a produção dos eicosanoides inflamatórios derivados do ácido araquidônico pelas vias da ciclo-oxigenase e da lipo-oxigenase, e pelas vias não enzimáticas, o óleo de peixe poderia fornecer uma alternativa para o controle da asma. Então, porque os efeitos da suplementação com óleo de peixe na asma têm se mostrado inconsistentes até a presente data? Os mecanismos envolvidos nesse efeito limitado do óleo de peixe na asma estão relacionados com os mediadores inflamatórios com papel na hiper-responsividade brônquica?

Em contraste com os vários relatos sobre os efeitos anti-inflamatórios do óleo de peixe, poucos estudos foram realizados sobre sua ação na funcionalidade do músculo liso das vias aéreas, o que é determinante para a asma. Assim, o estudo dos efeitos do óleo de peixe sobre a funcionalidade do músculo liso das vias aéreas e da produção de mediadores inflamatórios no pulmão de asmáticos relacionados à mecânica respiratória poderia revelar os mecanismos que resultam na falta de evidências de efeitos consistentes dessa suplementação para o controle da asma.

No presente trabalho, foi avaliado o efeito da suplementação com óleo de peixe na força de contração do músculo liso das vias aéreas e na complacência pulmonar estática e na produção de mediadores inflamatórios nos pulmões de ratos asmáticos que participam ativamente na hiper-responsividade do músculo liso das vias respiratórias. A hipótese deste estudo é que a falta de efetividade do óleo de peixe na asma pode estar relacionada à funcionalidade do músculo liso das vias

aéreas e à produção de mediadores inflamatórios nos pulmões que participam na hiper-responsividade brônquica.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de ratos asmáticos com óleo de peixe sobre a contração do músculo liso das vias aéreas e a complacência pulmonar estática e sobre parâmetros inflamatórios relacionados com a hiper-responsividade brônquica e obstrução das vias aéreas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos sobre os seguintes parâmetros:

- a) Infiltração de células nas vias aéreas e perfil citológico no lavado bronco-alveolar (LBA);
- b) Capacidade fagocitária e de adesão de macrófagos alveolares;
- c) Contração e relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas;
- d) Complacência pulmonar estática;
- e) Espessura da parede das vias aéreas e obstrução por muco;
- f) Concentração das citocinas inflamatórias  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  nos pulmões;
- g) Concentração de prostaglandina  $\text{E}_2$ , tromboxano  $\text{B}_2$ , 8-isoprostano  $\text{F}_{2\alpha}$ , leucotrieno  $\text{B}_4$ , lipoxina  $\text{A}_4$  e resolvina  $\text{E}_1$  no tecido pulmonar;
- h) Perfil de ácidos graxos no tecido pulmonar.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ÓLEO DE PEIXE

No óleo de peixe, encontram-se quantidades substanciais de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI n-3) representados pelo ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (CALDER, YAQOOB, 2009), os quais apresentam cadeia longa (20 e 22 átomos de carbono, respectivamente) e insaturações múltiplas, com a primeira dupla ligação entre o terceiro e quarto átomos de carbono a partir do terminal metila, sendo, portanto, denominados n-3 (Figura 1).

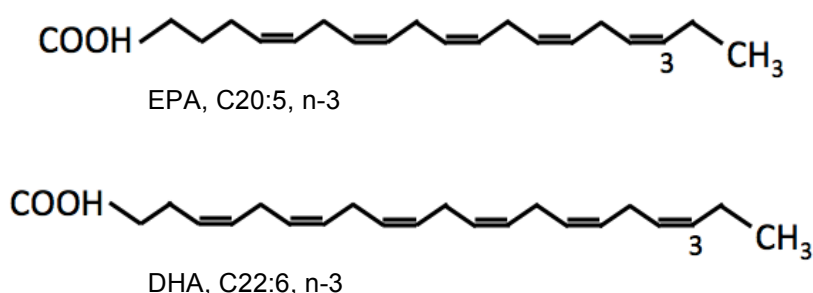
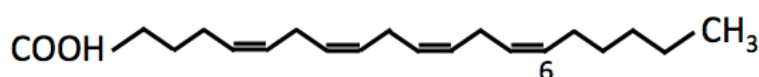


Figura 1. Fórmula estrutural condensada plana dos ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) e o código numérico que representa a estrutura. Na fórmula, os átomos de carbono são representados pelas pontas e inflexões entre os traços, e as ligações entre eles representadas pelos traços. O EPA contém 20 átomos de carbono, e 5 duplas ligações (representadas pelos traços duplos) e a primeira dupla ligação, contada a partir do terminal metila, está entre o terceiro e o quarto carbonos. O DHA contém 22 átomos de carbono e 6 duplas ligações, e a primeira dupla ligação também entre o terceiro e o quarto carbonos a partir do terminal metila. O código numérico, apresentado abaixo da fórmula estrutural e ao lado da abreviatura do nome sistemático, indica o número de carbonos após a letra C e o número de duplas ligações após os dois pontos, e ainda o número do carbono, contado a partir do terminal metila, em que está a primeira dupla ligação.

Esses ácidos graxos são classificados como essenciais na dieta humana por atender a dois requisitos: 1) o organismo não é capaz de sintetizá-lo; 2) são imprescindíveis ao organismo (GIUDETTI, CAGNAZZO, 2012). A importância dos ácidos graxos n-3 na dieta para a funcionalidade dos leucócitos é evidenciada desde a década de 1980, basicamente pela sua conversão em eicosanoides bioativos: as prostaglandinas, os leucotrienos, as tromboxanas e as lipoxinas

(YAQOOB; CALDER, 2007). Os eicosanoides são mediadores lipídicos com 20 carbonos, derivados de AGPI (CALDER, 2010b; SADIK; LUSTER 2012), que regulam as respostas inflamatórias e imunitárias (CALDER, 2010b; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Desde então, muitos estudos têm demonstrado o papel anti-inflamatório dos AGPI n-3 suplementados na dieta, e seus benefícios em doenças que envolvem processos inflamatórios.

Os efeitos anti-inflamatórios do óleo de peixe são atribuídos à incorporação de AGPI n-3 nas membranas celulares (CALDER, 2010b), que acontece dependendo da dose e do tempo de suplementação (CALDER, 2010b). A incorporação do EPA e DHA reduz a disponibilidade do ácido araquidônico (AA) para a produção de eicosanoides conhecidos por suas propriedades pró-inflamatórias, como as prostaglandinas e tromboxanos da série 2, e leucotrienos da série 4 (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009; CALDER, 2009; CALDER, 2010a). Isso porque o EPA e o DHA incorporados servem como substrato para as mesmas enzimas que convertem o AA em seus metabólitos pró-inflamatórios, inibindo assim essas vias enzimáticas (CALDER 2010b). O metabolismo do AA - um AGPI de 20 carbonos da família n-6 (a primeira ligação insaturada entre o sexto e sétimo átomos de carbono a partir do terminal metila) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011) (Figura 2) – é alvo de terapias anti-inflamatórias comumente utilizadas.



AA, C20:4, n-6

Figura 2. Fórmula estrutural condensada plana do ácido araquidônico (AA), também chamado de ácido eicosatetraenoico na nomenclatura sistemática e o código numérico que representa a estrutura. Esse ácido graxo poli-insaturado contém 20 átomos de carbono e 4 duplas ligações, com a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomos de carbono a partir do terminal metila. O código numérico, apresentado abaixo da fórmula estrutural e ao lado da abreviatura do nome comum (ou histórico), indica o número de carbonos após a letra C e o número de duplas ligações após os dois pontos, e ainda o número do carbono, contado a partir do terminal metila, em que está a primeira dupla ligação.

A produção desses eicosanoides inflamatórios inicia-se com a liberação do AA a partir de fosfolipídios da membrana através da fosfolipase A<sub>2</sub>, em resposta a estímulos inflamatórios (BURKE; DENNIS, 2009; SASTRE; DEL POZO, 2012). A

seguir, o AA pode ser rapidamente metabolizado em produtos intermediários oxigenados pela ação das ciclo-oxigenases (COX), ou das lipo-oxigenases (LOX) (Figura 3) ou ainda do citocromo P450 (SADIK; LUSTER, 2012). Esses produtos oxigenados são moléculas instáveis que rapidamente são transformadas nos eicosanoides inflamatórios biologicamente ativos por enzimas específicas que têm atividade sintetase ou isomerase (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Por exemplo, o AA pode ser convertido primeiramente em Prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) pela ciclo-oxigenase (COX) e a seguir, a enzima Prostaglandina D Sintase (PGDS) converte a  $PGH_2$  em prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), uma prostaglandina inflamatória biologicamente ativa (ALMISHRI *et al*, 2005). A  $PGH_2$  também pode ser convertida em Prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) – pela prostaglandina E Sintase (PGES) –, em tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) – pela tromboxano sintetase –, ou em  $PGI_2$  pela prostaciclina sintetase, ou  $PGF_{2\alpha}$  por uma enzima redutase. O produto final que é gerado a partir da  $PGH_2$  varia de acordo com o tipo de tecido e o padrão da expressão das enzimas sintetases específicas (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011) (Figura 3). O AA pode também ser primeiramente metabolizado em intermediários instáveis como os ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE) e em seguida em leucotrieno  $A_4$  ( $LTA_4$ ), também instável, pelas lipo-oxigenases (LOX) (EVANS *et al*, 2008; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010). A seguir enzimas específicas convertem o  $LTA_4$  nos metabólitos biologicamente ativos, como o leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ), o leucotrieno  $C_4$  ( $LTC_4$ ), leucotrieno  $D_4$  ( $LTD_4$ ) e leucotrieno  $E_4$  ( $LTE_4$ ) (Figura 3).

Os eicosanoides produzidos a partir do AA participam de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, modulando as respostas inflamatórias dependendo do local e do momento em que são produzidos no organismo, da natureza do estímulo, do tipo de células presentes, da sensibilidade dos tecidos-alvo e da concentração dos diferentes eicosanoides gerados. Esses eicosanoides atuam sobre a quimiotaxia de leucócitos, sobre a produção e liberação de outros mediadores lipídicos e peptídicos que participam das respostas inflamatórias (SADIK; LUSTER 2012), e seu papel na asma será discutido em um capítulo mais adiante. Apesar de a maioria dos eicosanoides gerados a partir do AA ter efeitos inflamatórios em muitas doenças, o AA também pode dar origem a mediadores que participam da resolução da inflamação como as lipoxinas (Figura 3). A lipoxina  $A_4$  ( $LXA_4$ ) tem um importante papel anti-inflamatório na asma (PLANAGUMA; LEVY, 2008).



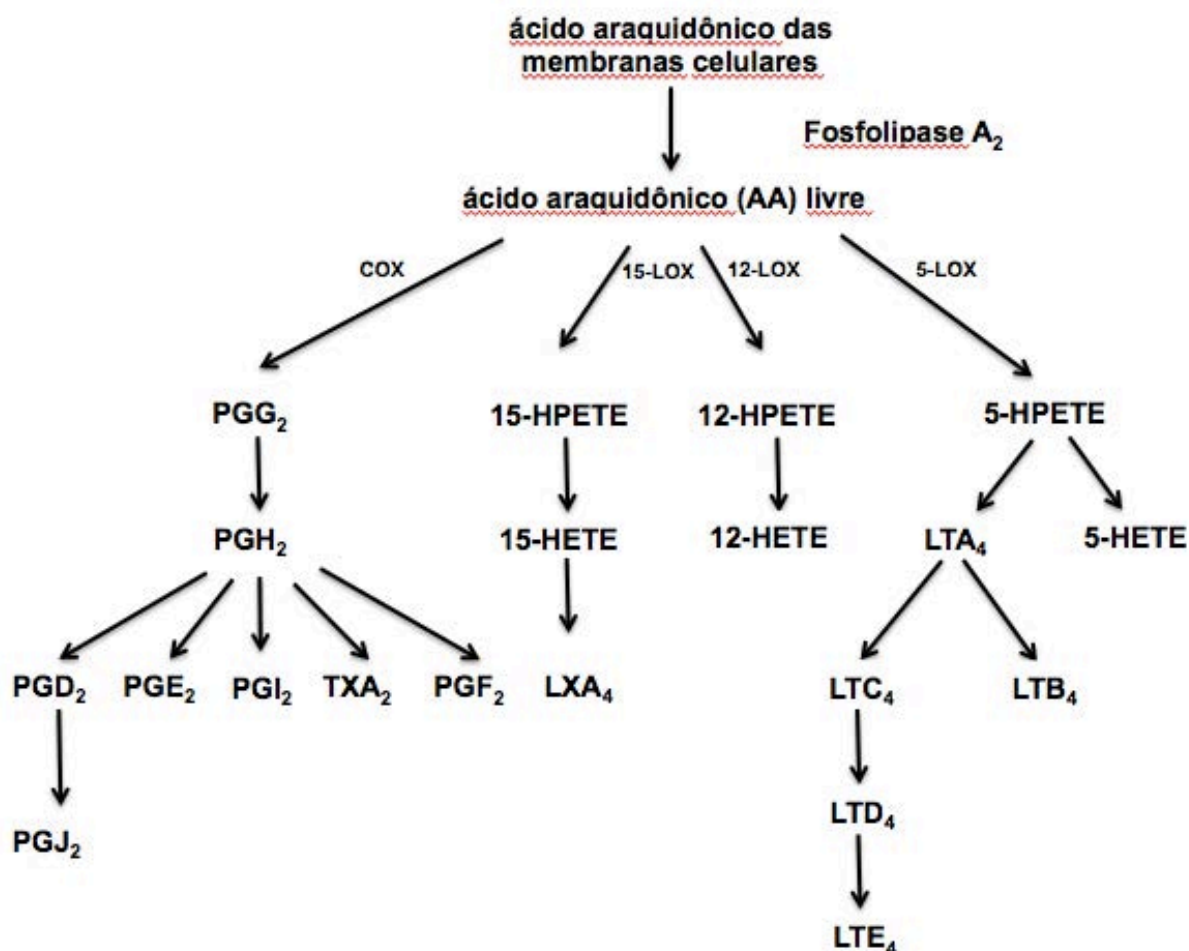


Figura 3. Visão geral da conversão de ácido araquidônico em eicosanoides. Adaptado de CALDER, 2006. AA = ácido araquidônico; COX = ciclo-oxigenase; LOX = lipo-oxigenase; HPETE = ácido hidroxiperoxidoeicosotetraenoico; HETE = ácido hidroxieicosatetraenoico; PGD<sub>2</sub> = prostaglandina D<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub> = prostaglandina I<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>; PGF<sub>2</sub> = prostaglandina F<sub>2</sub>; LXA<sub>4</sub> = lipoxina A<sub>4</sub>; LTA<sub>4</sub> = leucotrieno A<sub>4</sub>; LTB<sub>4</sub> = leucotrieno B<sub>4</sub>; LTC<sub>4</sub> = leucotrieno C<sub>4</sub>; LTD<sub>4</sub> = leucotrieno D<sub>4</sub>; LTE<sub>4</sub> = leucotrieno E<sub>4</sub>.

A incorporação dos AGPI n-3 nas membranas celulares pode ainda fornecer substrato para a formação de eicosanoides considerados menos inflamatórios, tais como as prostaglandinas da série 3 e os leucotrienos da série 5, e eicosanoides com papel na resolução da inflamação, como as resolvinas E e D. As prostaglandinas da série 3 e os leucotrienos da série 5 são formados a partir do EPA incorporado nas membranas celulares de leucócitos, pelas vias da ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX), respectivamente (Figura 4).

Esses eicosanoides têm uma estrutura ligeiramente diferente da dos eicosanoides formados pelas mesmas vias enzimáticas a partir do ácido araquidônico (AA) e apresentam menor potencial inflamatório que esses últimos, por

serem menos potentes agentes quimiotáticos de neutrófilos ou por terem menor ação sobre a indução da produção de citocinas ou expressão de genes inflamatórios. O EPA e o DHA também podem servir de substratos para a ciclo-oxigenase, dando origem às resolvinas E e D, respectivamente, as quais são consideradas anti-inflamatórias, por participarem da resolução da inflamação (Figura 4). A resolvina E1 (RvE1), por exemplo, inibe a transmigração de leucócitos polimorfonucleares através da membrana endotelial e barreiras epiteliais e promove o *clearance* por macrófagos de células polimorfonucleares apoptóticas em processos inflamatórios (SCHWAB *et al*, 2007).

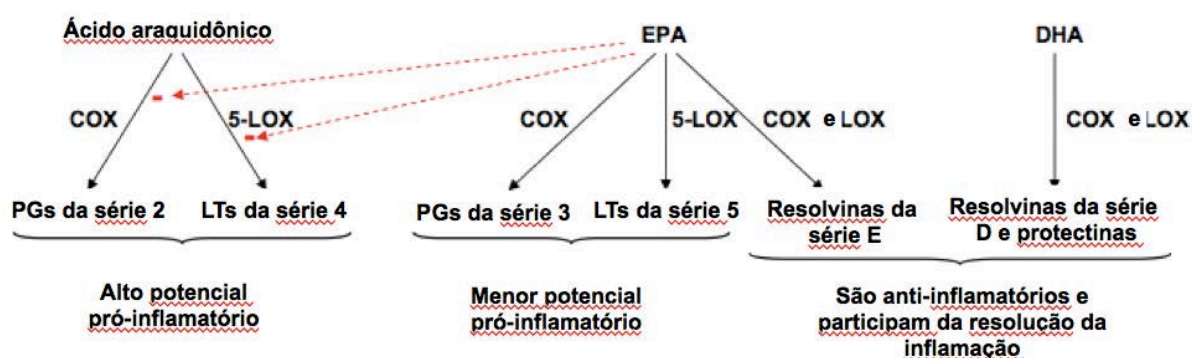


Figura 4. Visão geral da síntese de mediadores lipídicos a partir do ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) e seus efeitos na inflamação. Adaptado de CALDER, 2010c. PGs = prostaglandinas; LTs = leucotrienos; COX = ciclo-oxigenase; 5-LOX = lipo-oxigenase.

Além de modificar o perfil de mediadores lipídicos, a suplementação com óleo de peixe pode influenciar a produção de mediadores peptídicos, como as citocinas e outras quimiocinas, e a expressão de moléculas de adesão, o que pode ser resultado das alterações sobre a produção de eicosanoides, mas também pode ser por mecanismos de ação independentes da modificação do perfil de eicosanoides (CALDER, 2009). Por exemplo, as resolvinas, geradas a partir do EPA e DHA inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , que seria um efeito resultante da modificação do perfil de eicosanoides (CALDER, 2012b). Mas o óleo de peixe pode também exercer seus efeitos anti-inflamatórios por reduzir a ativação de fatores de transcrição, como o Fator Nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B* -  $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) (CALDER, 2011; CALDER, 2013). O  $\text{NF}\kappa\text{B}$  é

considerado de importância central, regulando a expressão de muitos genes envolvidos nas respostas inflamatórias, frequentemente funcionando em conjunto com outros fatores de transcrição de genes inflamatórios e imunológicos. Esse fator de transcrição é um potente indutor da produção de citocinas inflamatórias, como por exemplo a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) e é o principal fator de transcrição envolvido na regulação de moléculas de adesão e genes da ciclo-oxigenase-2. O NF $\kappa$ B consiste basicamente de cinco subunidades proteicas, entre elas a p50 e p65, que se encontram associadas a uma proteína inibitória (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) no citoplasma das células, associação essa que impede que o NF $\kappa$ B seja translocado para o núcleo das células (CALDER, 2012b). Quando as células são estimuladas por um sinal apropriado, o I $\kappa$ B- $\alpha$  é fosforilado (por proteínas cinases), poliubiquitinado, e degradado, permitindo que o NF $\kappa$ B penetre o núcleo e possa ligar-se a sequências específicas da região promotora de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, enzimas das vias de síntese dos mediadores lipídicos, imunoreceptores e moléculas de adesão, amplificando o processo inflamatório (MANKAN *et al*, 2009; JUNG *et al*, 2012).

Por causa da evidência de efeitos benéficos em várias inflamações patológicas (WADA *et al*, 2007), incluindo artrite reumatoide, doença de Crohn, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e câncer (CALDER, 2013), o consumo de AGPI n-3 (EPA e DHA) tem sido recomendado (VILLANI *et al*, 2013). Em algumas doenças, já foi demonstrado que a suplementação com óleo de peixe pode melhorar os sintomas, e dessa forma se estabelece como medicina complementar em alguns países e está entre os suplementos nutricionais mais frequentemente utilizados, depois das vitaminas e minerais (VILLANI *et al*, 2013).

Devido a esses efeitos anti-inflamatórios, foi postulado que o óleo de peixe também tenha efeitos na asma. Assim alguns trabalhos foram realizados e embora um ou outro tenham demonstrado efeito do óleo de peixe sobre parâmetros inflamatórios (ARM *et al*, 1988, MICKLEBOROUGH *et al*, 2006), como na quimiotaxia de leucócitos e na modificação da produção de mediadores lipídicos em asmáticos, a maioria revelou efeitos clínicos inconsistentes (THIEN *et al*, 2002; CALDER, 2006), o que sugere poucas evidências da eficácia da suplementação com óleo de peixe na asma.

## 2.2 ASMA

O termo asma origina-se do vocábulo grego  $\delta\sigma\theta\mu\alpha$  e significa estar sufocado ou ofegante, e era usado para descrever todas as doenças respiratórias e a falta de ar (HOLGATE, 2010). Nos últimos 60 anos, o conceito de asma apresentou muitas modificações significativas e os conhecimentos foram sendo paulatinamente agregados, proporcionando progressos no tratamento (SILVA; HETZEL, 1998). Há 60 anos, a asma ainda era conceituada basicamente como uma doença que produzia broncoespasmo episódico, caracterizado por contração do músculo liso das vias aéreas, e tratada com uso de broncodilatadores. Esse conceito da asma, que havia sido introduzido em 1860, a diferenciava de outras doenças brônquicas e pulmonares. Em meados de 1980, a presença da hiper-responsividade das vias aéreas na asma foi reconhecida, e os estudos voltaram-se para a identificação das suas causas. O conhecimento dos mecanismos imunológicos e de hipersensibilidade das vias aéreas na asma, adquirido com o progresso da fisiopatologia e da imunologia, levaram ao reconhecimento da asma como doença inflamatória e o uso dos glicocorticoides inalatórios ampliou as opções terapêuticas da asma (SILVA; HETZEL, 1998; SEROOGY; GERN, 2005; BATES *et al*, 2009; HOLGATE, 2010). A asma foi relacionada com as respostas alérgicas atópicas, e o papel dos eosinófilos como células centrais na inflamação asmática emergiu (BATES *et al*, 2009). As pesquisas na área da asma também relacionaram os linfócitos T ao recrutamento dos eosinófilos e muitos fatores inflamatórios relacionados foram identificados. A partir do início dos anos 1990, as respostas imunitárias foram diferenciadas de acordo com a funcionalidade dos linfócitos T - em respostas T helper<sub>1</sub> (Th<sub>1</sub>) e T helper<sub>2</sub> (Th<sub>2</sub>) - e com as diferentes citocinas produzidas por eles, o que forneceu uma compreensão mais clara da forma como a exposição a alérgenos poderia iniciar uma resposta IgE específica envolvendo mastócitos, basófilos e eosinófilos (ROBINSON *et al*, 1992; ROBINSON *et al*, 1993; KLINE; HUNNINGHAKE, 1994; HOLGATE, 2010). A partir de então, houve um grande aumento do conhecimento das vias alérgicas da inflamação asmática (BARRIOS *et al*, 2006) e outras citocinas envolvidas foram descobertas, bem como as populações de linfócitos T distintas que as produzem (ROBINSON, 2009; BATES *et al*, 2009; HOLGATE, 2010; LLOYD; HESSEL, 2010). O envolvimento das populações de

células T helper<sub>17</sub> (Th<sub>17</sub>), T helper<sub>9</sub> (Th<sub>9</sub>) e T regulatórias (T<sub>reg</sub>) e das citocinas produzidas por elas na patogenia da asma ainda está sendo elucidado (DURRANT; METZGER, 2010; LLOYD; HESSEL, 2010). A descoberta do papel dos mediadores lipídicos, como os leucotrienos na hiper-responsividade característica da asma levaram ao desenvolvimento de outros medicamentos, como os antagonistas dos receptores de leucotrienos e os inibidores da síntese de leucotrienos (HOLGATE, 2010).

Atualmente, a asma é considerada uma desordem complexa e heterogênea (KIM *et al*, 2010), com muitos mecanismos moleculares subjacentes à inflamação das vias aéreas e à hiper-responsividade (DURRANT; METZGER, 2010) e que envolve fatores genéticos e ambientais (MATANGKASOMBUT *et al*, 2009; HOLLOWAY, 2010). São conhecidos também outros tipos de asma (MATANGKASOMBUT *et al*, 2009) que parecem não envolver mecanismos dependentes da IgE, como, por exemplo, asma induzida por exercício, asma ocupacional, asma por aspirina, asma associada ao uso de  $\beta$ -bloqueadores, associada ao refluxo gastroesofágico e associada à doença das vias aéreas superiores (SILVA; HETZEL, 1998; DURRANT; METZGER, 2010), mas a asma alérgica é a mais comum (BARRIOS *et al*, 2006; MATANGKASOMBUT *et al*, 2009; MEDOFF *et al*, 2009; FINKELMAN *et al*, 2010; KIM *et al*, 2010) e a mais estudada (BHAKTA; WOODRUFF, 2011). Neste trabalho, os mecanismos da resposta imunológica da asma alérgica serão abordados, justamente pela relação com o modelo de indução à asma utilizado para o estudo experimental.

### 2.2.1 Patogenia da asma alérgica

Apesar do aumento do conhecimento dos mecanismos envolvidos na asma a prevalência dessa doença tem continuado a aumentar (MEDOFF *et al*, 2009) e a falta de eficácia dos tratamentos anti-inflamatórios tem sido desapontadora (DURRANT; METZGER, 2010). A asma alérgica é uma doença caracterizada pela inflamação, obstrução reversível das vias aéreas e hiper-responsividade do músculo liso, desencadeadas pela exposição a um alérgeno (BHAKTA; WOODRUFF, 2011).

Quando um alérgeno presente no ambiente entra em contato com a superfície mucosa do epitélio, penetrando o muco e a barreira epitelial, induz uma liberação de citocinas envolvendo receptores de reconhecimento de patógenos no epitélio e células mieloides residentes do pulmão, incluindo macrófagos, células dendríticas e mastócitos (LOCKSLEY, 2010). A inflamação das vias aéreas é sustentada a partir dessa fase inicial através da interação entre o epitélio das vias aéreas e células processadoras de antígenos, como as células dendríticas, embora estudos recentes demonstrem que os basófilos também possam servir para essa função em algumas situações nas inflamações alérgicas (KIM *et al*, 2010; LOCKSLEY, 2010). O reconhecimento, a captação, o processamento e a subsequente apresentação de antígeno nos complexos de histocompatibilidade (MHC de classe II) por células apresentadoras de antígeno, as células dendríticas, juntamente com o acoplamento de moléculas de coestimulação nas células T iniciam a resposta do sistema imunitário adaptativo (RICCI *et al*, 1994; HOLGATE, 2010; KIM *et al*, 2010), que, através do desenvolvimento de células T de memória, da diferenciação das células T no subtipo Th<sub>2</sub> (BATES *et al*, 2009) (Figura 5) e desenvolvimento de plasmócitos secretores de anticorpos (REINHARDT *et al*, 2009; LOCKSLEY, 2010; BHAKTA; WOODRUFF, 2011), estabelece a cronicidade sobre a exposição ao alérgeno (LOCKSLEY, 2010). A ativação dos linfócitos T promove a quimiotaxia dos leucócitos, através da liberação de quimiocinas, como eotaxinas, TARC (*Thymus and Activation-Regulated Chemokine*), MDC (*macrophage-derived chemokine*), RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) e MCPs1-3 (*Monocyte Chemotatic Proteins 1-3*) que aumentam a expressão de moléculas de adesão nesses leucócitos, os quais, por sua vez, interagem com o endotélio microvascular (GUNDEL *et al*, 1991; HOLGATE, 2010).

A subsequente exposição ao mesmo alérgeno estimula a secreção de citocinas por linfócitos Th<sub>2</sub>, através da ativação coordenada de um grupo de genes que codificam as interleucinas-3, -4, -5, -9, e -13 e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos/macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, GM-CSF). Essas citocinas iniciam e mantêm as características patofisiológicas da asma (LLOYD; HESSEL, 2010). As citocinas Th<sub>2</sub>, em particular a IL-5 e a IL-4 também são responsáveis pela ligação entre a resposta imunitária inata e adaptativa, promovendo a proliferação de eosinófilos na medula óssea e subsequente migração para o pulmão (BATES *et al*, 2009; KIM *et al*, 2010).

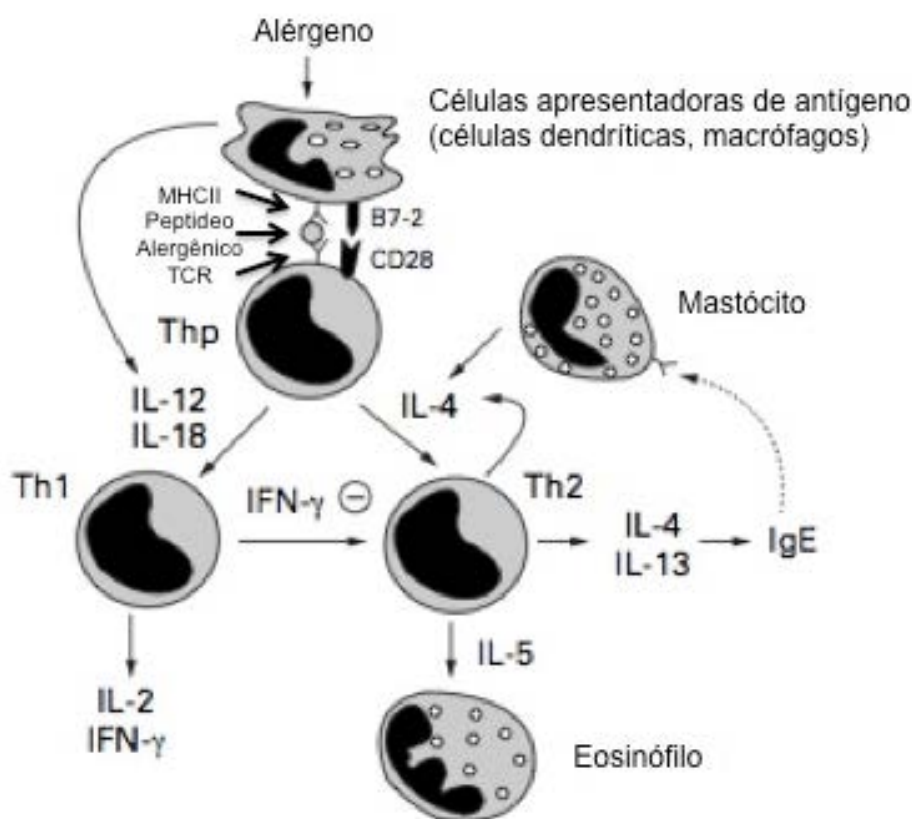


Figura 5. Esquema da apresentação de antígeno com ativação de células T helper progenitoras (Thp), preferencialmente em células T helper 2 (Th2) do que T helper 1 (Th1), e citocinas envolvidas. Adaptado de CHUNG; BARNES, 1999. MHCII = complexo principal de histocompatibilidade classe II; Thp = células T *helper* progenitoras; B7-2 = molécula coestimulatória de superfície; CD28 = *cluster of differentiation* 28; IL= interleucina; INF-γ = interferon-gama; IgE = imunoglobulina E.

Nos pulmões, as células Th<sub>2</sub> aumentam a sobrevivência de eosinófilos e basófilos, pela secreção de IL-5 e IL-3, respectivamente, facilitam a sobrevivência de mastócitos, pela secreção de IL-9 (KIM *et al*, 2010; LOCKSLEY, 2010), e contribuem para elaboração de IL-4 e IL-13 (MEDOFF *et al*, 2009), as quais são necessárias para as manifestações epiteliais e musculares da doença (LOCKSLEY, 2010), regulando a hiper-responsividade das vias aéreas (GRUNIG *et al*, 1998; FINKELMAN *et al*, 2010; KIM *et al*, 2010) e a secreção de muco (GRUNIG *et al*, 1998; WILLS-KARP *et al*, 1998; KIM *et al*, 2010). A IL-4 também está implicada na regulação da síntese de IgE antígeno-específica na asma alérgica (BATES *et al*, 2009; FINKELMAN *et al*, 2010; KIM *et al*, 2010; BHAKTA; WOODRUFF, 2011). A ligação de IgE específica do antígeno ao seu receptor Fcε (FcεR) nos mastócitos promove a degranulação, e conduz a uma rápida produção de mediadores lipídicos, como os eicosanoides inflamatórios (SADIK; LUSTER, 2012), e mediadores bronco

e vasoativos, como a histamina (BATES *et al*, 2009; LOCKSLEY, 2010), o que está relacionado à queda da função respiratória após o desafio alergênico. A ativação do FcεR em mastócitos, basófilos, eosinófilos e macrófagos também amplifica o processo inflamatório, através do direcionamento para a síntese de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos (SHUM *et al*, 2008) que sustentam o recrutamento, a retenção e o prolongamento da vida útil de células mielóides, incluindo eosinófilos, basófilos e mastócitos, nos tecidos envolvidos (SILVA; HETZEL, 1998; LOCKSLEY, 2010, SADIK; LUSTER, 2012).

Os macrófagos ativados através dos receptores FcεR se tornam importante fonte de liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α e a IL-1β (CHUNG; BARNES, 1999). Essas citocinas podem agir sobre as células epiteliais, promovendo a liberação de outras citocinas e quimiocinas como GM-CSF, IL-8 e RANTES, as quais amplificam a resposta inflamatória e levam ao influxo principalmente de eosinófilos. Esses, por sua vez, também liberam múltiplas citocinas (CHUNG; BARNES, 1999).

No modelo animal de asma, são realizados procedimentos que levam a uma sensibilização sistêmica com um alérgeno (mais comumente ovalbumina) em conjunto com um coadjuvante (hidróxido de alumínio), que é responsável por desviar a resposta imunitária para a do tipo Th<sub>2</sub> (KIM *et al*, 2010; LLOYD; HESSEL, 2010), e a exposição do animal ao aerossol com o mesmo alérgeno, que resulta nos sintomas típicos da asma (UMETSU *et al*, 2002; WAHL *et al*, 2004; KIM *et al*, 2010; LLOYD; HESSEL, 2010). Tanto na asma como no modelo animal de asma induzida por ovalbumina, os eventos que se seguem à exposição ao alérgeno resultam em hiper-responsividade das vias aéreas a uma variedade de estímulos específicos e não específicos, inflamação eosinofílica nos pulmões, produção sérica de IgE e produção de citocinas Th<sub>2</sub> (WILLS-CARP *et al*, 1998; LLOYD; HESSEL, 2010) e citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-1β nos pulmões (CHUNG; BARNES, 1999). Na histopatologia pulmonar são vistos infiltrado leucocitário peribronquiolar, e deposição de muco e descamação epitelial no lúmen bronquiolar (BOCHNER *et al*, 1994, ELIAS *et al* , 2003).

Assim, a presença em grande número de células imunitárias na parede e na luz das vias aéreas, as quais normalmente não seriam encontradas, e a liberação de diversos mediadores da inflamação – peptídicos, lipídicos e outros – causam a ativação de células que passam a influenciar o ambiente inflamatório pulmonar



(SILVA; HETZEL, 1998; SADIK; LUSTER, 2012). Além disso, há uma alteração na atividade das células não imunitárias (SILVA; HETZEL, 1998), como as epiteliais e musculares lisas das vias aéreas, que também são capazes de responder aos mediadores inflamatórios e de secretar citocinas (TLIBA *et al*, 2008; DAMERA *et al*, 2009; BHAKTA; WOODRUFF, 2011) e eicosanoides (BELVISI *et al*, 1997; BARNES, 2011). Desse modo, as células epiteliais e musculares podem ser efetoras e perpetuar a inflamação asmática (DAMERA *et al*, 2009; BHAKTA; WOODRUFF, 2011; OZIER *et al*, 2011; LEVY, 2005; JAMES *et al*, 2007; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010). Além do seu papel na inflamação asmática, as células musculares das vias aéreas se contraem aos estímulos específicos (alérgenos) e não específicos (mediadores inflamatórios e outros), sendo portanto fundamentais para a hiper-responsividade das vias aéreas na asma (WATANABE *et al*, 2009; OZIER *et al*, 2011).

## 2.2.2 Mediadores da inflamação asmática

### 2.2.2.1 Mediadores proteicos

O TNF- $\alpha$  está envolvido na patogênese da asma (BROIDE *et al*, 2001; BOERO *et al*, 2010; CHEN, 2011; JUNG *et al*, 2012) e tem sido implicado na resposta inflamatória asmática (MEILER *et al*, 2006; NAM *et al*, 2009), estando presente em grande quantidade nas vias aéreas de asmáticos (BRADDING *et al*, 1994; BROIDE *et al*, 2001; HOLTMANN; NEURATH, 2004; HOWARTH *et al*, 2005; DAMERA *et al*, 2009; CIEBIADA *et al*, 2011; CHO, 2011). O TNF- $\alpha$  é produzido por várias células (REUTER *et al*, 2008) além dos macrófagos alveolares, incluindo neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, e as epiteliais (NAM *et al*, 2009) e musculares lisas das vias aéreas (CHUNG; BARNES, 1999). Liberado imediatamente após o desafio alergênico na asma, é um forte agente quimiotático (HOLTMANN; NEURATH, 2004), promovendo o aumento de neutrófilos (TRIFILIEFF *et al*, 2002; DRAGON *et al*, 2007; TOWNLEY; HORIBA, 2003; NAM *et al*, 2009; CHAI *et al*, 2011), eosinófilos (TRIFILIEFF *et al*, 2002; NAM *et al*, 2009; CHAI *et al*, 2011),

macrófagos alveolares (TOWNLEY; HORIBA, 2003) e linfócitos (NAKAE *et al*, 2005) nas vias aéreas. Ele exerce seus efeitos aumentando a expressão de moléculas de adesão (LASSALLE *et al*, 1993; NAM *et al*, 2009; BABU *et al*, 2011; CHAI *et al*, 2011; JUNG *et al*, 2012) e a produção de quimiotaxinas (YOSHIFUKU *et al*, 2007), e ainda aumenta a produção de citocinas Th<sub>2</sub> nos pulmões em resposta ao desafio antigênico (NAKAE *et al*, 2007).

A IL-1 $\beta$  também participa da resposta inflamatória asmática (ROSENWASSER, 1998; DRAGON *et al*, 2007), sendo encontrada em altas concentrações no lavado broncoalveolar de asmáticos, e é produzida em grande parte por macrófagos alveolares, mas também por outros leucócitos, células epiteliais (DRAGON *et al*, 2007), endoteliais e musculares das vias aéreas (CHUNG; BARNES, 1999). Sua ação sobre as células epiteliais, assim como a do TNF- $\alpha$ , resulta tanto em liberação de fatores quimiotáticos como interleucina-8 (IL-8), GM-CSF, e RANTES, o que amplifica a resposta inflamatória e o recrutamento de eosinófilos e neutrófilos (DRAGON *et al*, 2007), e também em aumento da expressão de moléculas de adesão (CHUNG; BARNES, 1999). Portanto, muitas das ações da IL-1 $\beta$  são bem similares às do TNF- $\alpha$ , e estas ocorrem combinadas com outras citocinas. Ambas podem induzir a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , tendo um importante efeito na amplificação da inflamação asmática e na hiper-responsividade brônquica a vários estímulos, através de sua ação no músculo liso das vias aéreas (CHUNG; BARNES, 1999), que é revisada mais adiante. Ambas também regulam a liberação de mediadores lipídicos inflamatórios, através de aumento da expressão das enzimas das vias de síntese desses mediadores em todos os tipos celulares presentes nos pulmões (BELVISI *et al*, 1997).

#### 2.2.2.2 Mediadores lipídicos

Os eicosanoides derivados do AA também estão entre os mediadores lipídicos que promovem as respostas características da asma como a eosinofilia, a secreção de muco e a bronco-constricção, ao contato com o alérgeno (DUTT *et al*, 2011; BARALDI *et al*, 2003; GIUDETTI; CAGNAZZO, 2012). As prostaglandinas e os tromboxanos da série 2 e os leucotrienos da série 4 são gerados pelas vias

enzimáticas explicadas no primeiro item desta revisão, principalmente por leucócitos ativados. Na asma, a produção destes eicosanoides é rápida quando comparada com a produção de mediadores peptídicos e não se restringe aos leucócitos, uma vez que as células epiteliais e as células do músculo liso das vias aéreas são também fontes para a síntese de prostaglandinas e tromboxanos (BELVISI *et al*, 1997) e de leucotrienos (BARNES, 2011). Esses eicosanoides inflamatórios se ligam a receptores específicos para estender o recrutamento de leucócitos nas vias respiratórias, a liberação de citocinas, a produção de outros mediadores lipídicos, o edema, a produção de muco, a lesão do epitélio pulmonar e o aumento da responsividade brônquica a vários estímulos (BARNES, 2011). As prostaglandinas e os tromboxanos da série 2 promovem a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular nos pulmões, contribuindo para os processos inflamatórios como aumento do fluxo sanguíneo e diapedese (TILLEY *et al*, 2003). No entanto, o papel desses prostanoídes nos pulmões depende da sua concentração, do seu perfil de liberação e da presença dos receptores específicos, podendo apresentar uma variedade de efeitos. Foi demonstrado, por exemplo, que a PGE<sub>2</sub> apresenta um efeito anti-inflamatório e bronco-protetor na asma (BELVISI *et al*, 1997). Os leucotrienos são potentes agentes quimiotáticos e secretagogos (BONNANS; LEVY, 2007), e sua produção aumentada na asma pode contribuir para a formação e manutenção da inflamação e obstrução das vias aéreas (LEVY, 2005).

A lesão de tecidos e a ativação de leucócitos ao contato com o alérgeno podem dar origem ao estresse oxidativo, e a oxidação não enzimática do AA também ocorre, gerando isoprostanos, como por exemplo os Isoprostanos PGF<sub>2α</sub> (8-Iso Prostaglandin F<sub>2α</sub>) (JANSSEN, 2000; YIN *et al*, 2009). Esses mediadores lipídicos são isômeros das prostaglandinas (Figura 6), e também contribuem para os efeitos prejudiciais sobre as funções das vias respiratórias, incluindo a contração do músculo liso das vias aéreas (JANSSEN, 2000), a hipersecreção de muco, a descamação epitelial, a exsudação vascular e a hiper-responsividade brônquica (BARALDI *et al*, 2003; DUTT *et al*, 2011). Os níveis de isoprostanos estão aumentados em pacientes asmáticos e em modelos experimentais de asma (MONTUSCHI *et al*, 1999; YIN *et al*, 2009; DUTT *et al*, 2011), o que contribui para a obstrução das vias aéreas e a injúria tecidual.

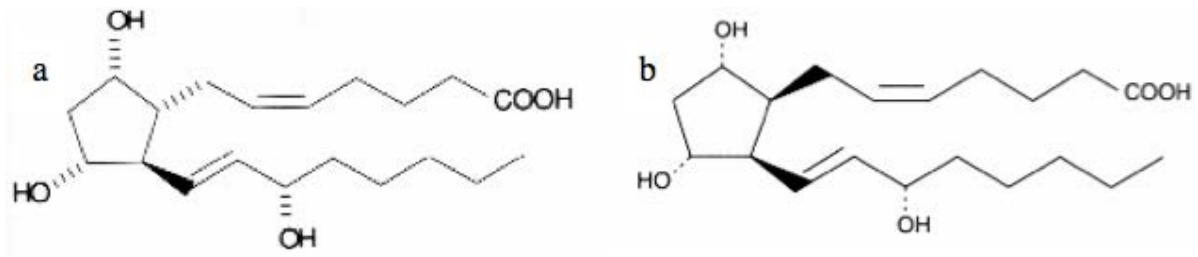


Figura 6. Estrutura da Prostaglandina  $F_2$  ( $PGF_2$ ) (a) e de seu isômero, gerado por peroxidação lipídica, 8-Isoprostano  $F_2$  (8-Iso- $PGF_2$ ) (b).

Na asma, um importante mediador lipídico derivado também do AA é a lipoxina. As lipoxinas, assim como os leucotrienos, são geradas pela via enzimática das lipo-oxigenases (Figura 7).

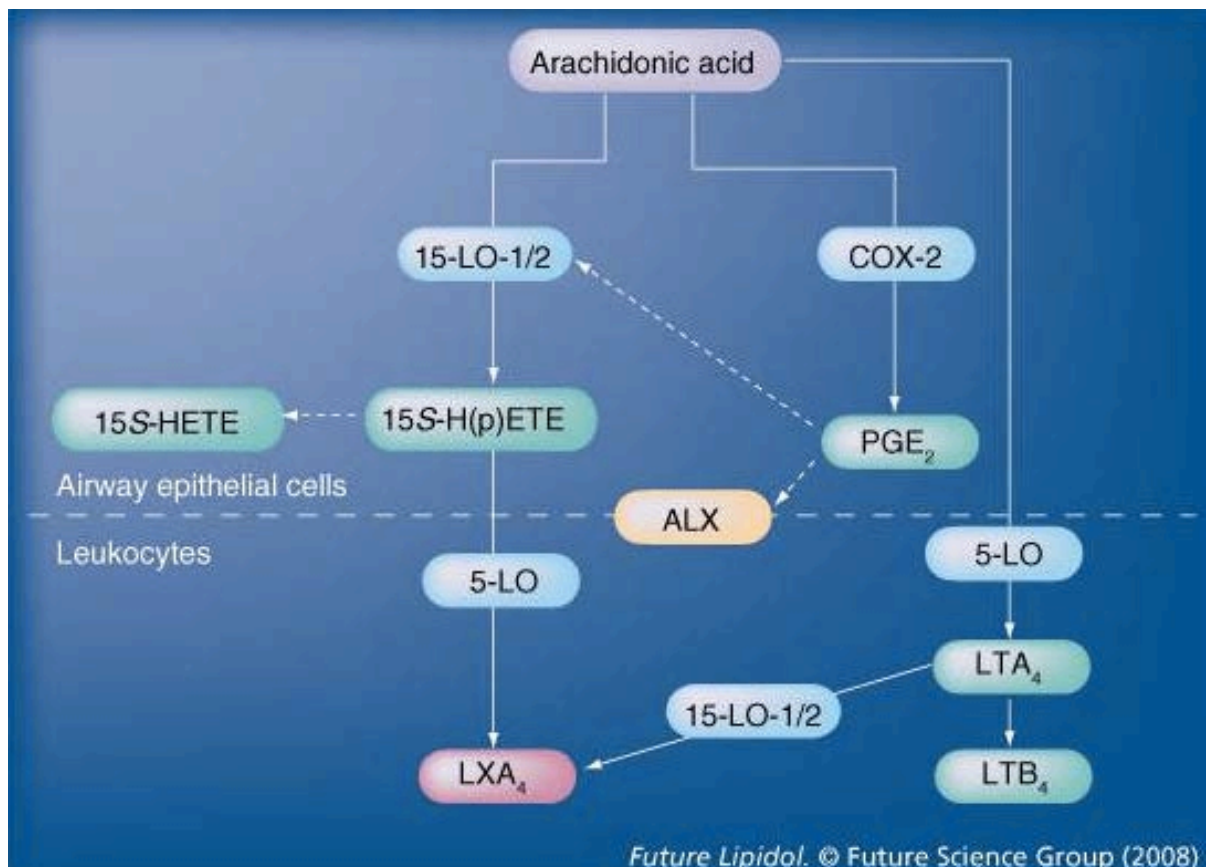


Figura 7. Biossíntese da lipoxina nas vias aéreas (PLANAGUMA; LEVY, 2008). 15-LO-1/2 – 15-lipo-oxigenase 1 ou 2; 15-S-H(p)ETE – 15-S-ácido hidroperoxidoeicosotetraenoico; HETE – ácido hidroxieicosatetraenoico; 15-S-HETE – 15-S-ácido hidroxieicosatetraenoico; 5-LO – 5-lipo-oxigenase; LXA<sub>4</sub> – Lipoxina A<sub>4</sub>; ALX – receptor de lipoxina A<sub>4</sub>; COX-2 – Ciclo-oxigenase-2; PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>; LTA<sub>4</sub> – leucotrieno A<sub>4</sub>; LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>.

A principal via de biossíntese de lipoxinas nos tecidos respiratórios envolve as enzimas 5- e 15-LOX (BONNANS; LEVY, 2007) e ocorre durante as interações celulares entre os leucócitos (principalmente eosinófilos ou outros polimorfonucleares) e o epitélio (LEVY, 2005). A 15-LOX, enzima abundante e ativa nos pulmões durante a inflamação das vias aéreas, converte o AA a um composto intermediário que serve como substrato para a 5-LOX que a seguir o converte em lipoxina (LEVY, 2005; PLANAGUMA; LEVY, 2008). O LTA<sub>4</sub> produzido a partir de AA pela 5-LOX também pode ser convertido em lipoxina pela 15-LOX (Figura 7) (PLANAGUMA; LEVY, 2008).

No entanto, as ações biológicas das lipoxinas diferem das dos leucotrienos. A lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>), por exemplo, inibe a quimiotaxia dos linfócitos e granulócitos (eosinófilos, mastócitos, basófilos), a sua transmigração através das células endoteliais e epiteliais, e a diapedese para os tecidos inflamados em modelos animais de asma. A LXA<sub>4</sub> liberada após o desafio alergênico na asma atua no recrutamento de monócitos e células dendríticas para o local da inflamação e na ativação dos macrófagos derivados desses monócitos, iniciando a fagocitose dos granulócitos apoptóticos. Esses mecanismos de inibição da entrada e o *clearance* de granulócitos (mas não de monócitos) ativados pela LXA<sub>4</sub> são necessários para a resolução da inflamação asmática (LEVY *et al*, 2002; BONNANS, LEVY, 2007). Assim, a resolução da inflamação asmática, não depende somente da redução dos eicosanoides inflamatórios, mas também da liberação das lipoxinas. A formação das classes distintas dos eicosanoides pró e anti-inflamatórios é finamente regulada, sendo que os próprios eicosanoides derivados da COX após o desafio alergênico pulmonar (como por exemplo a PGE<sub>2</sub>) são críticos para a produção das lipoxinas na fase de resolução da inflamação (LEVY *et al*, 2002, BONNANS; LEVY, 2007).

### 2.2.3 Hiper-responsividade do músculo liso das vias aéreas e mediadores inflamatórios

A hiper-responsividade das vias aéreas, que é uma resposta excessiva a estímulos específicos e inespecíficos, é uma característica fisiológica que define a asma (RUBIN *et al*, 1987; SOLWAY; FREDBERG, 1997; ELIAS *et al*, 2003;

TOWNLEY; HORIBA, 2003; LLOYD; HESSEL, 2010; NOBLE *et al*, 2012; PASCOE *et al*, 2012), e é iniciada pela exposição a um estímulo, que normalmente é tolerado em indivíduos não asmáticos. Ela leva à constrição brônquica em indivíduos alérgicos (LLOYD; HESSEL, 2010; WANG *et al*, 2010), e é responsável pelos episódios recorrentes de sibilo e falta de ar na asma (OZIER *et al*, 2011), sendo portanto a anormalidade predominante que resulta em perda de função pulmonar (TOWNLEY; HORIBA, 2003; DURRANT; METZGER, 2010). A constrição brônquica depende essencialmente da funcionalidade do músculo liso das vias aéreas (TLIBA *et al*, 2008; WANG *et al*, 2010; BLACK *et al*, 2012), e a contração da musculatura lisa das vias aéreas é o principal fator responsável pela obstrução (DAMERA *et al*, 2009).

A contração do músculo liso das vias aéreas pode ser induzida por uma variedade de mensageiros extracelulares (COOPER *et al*, 2009a), que atuam através da interação com receptores específicos na membrana plasmática do músculo liso das vias aéreas. Estes agonistas contráteis, podem ser os mediadores inflamatórios ou os neurotransmissores, os quais são liberados em concentrações elevadas nos brônquios de asmáticos (OZIER *et al*, 2011). A acetilcolina (ACh), neurotransmissor liberado pelas fibras aferentes do sistema nervoso parassimpático que inervam os pulmões, promove a contração do músculo liso das vias aéreas. Por ser um agonista contrátil, a acetilcolina é utilizada experimentalmente para avaliar a força de contração do músculo liso brônquico, assim como a metacolina e 5-hidroxitriptamina, usadas para avaliar a hiper-responsividade (WANG *et al*, 2010; OZIER *et al*, 2011). Elas se ligam a receptores muscarínicos  $M_3$ , acoplados a proteínas  $G_q$ , que atuam produzindo efeitos excitatórios por via do fosfato de inositol ( $IP_3$ ) (SHORE; MOORE, 2002), causando aumento na concentração citosólica de cálcio iônico (SHORE; MOORE, 2002, BLACK *et al*, 2012), o que ativa a cadeia leve de miosina quinase (MLCK) que, por sua vez, fosforila a cadeia leve de miosina (MCL), estimulando o ciclo de contração das pontes cruzadas no músculo liso das vias aéreas (WANG *et al*, 2010; SHORE; MOORE, 2002) (Figura 8). O carbacol, a bradicinina (BK), a neurocinina A (NKA) e a trombina também atuam nos receptores acoplados a proteínas  $G_q$  e aumentam a contração do músculo liso (Figura 8).

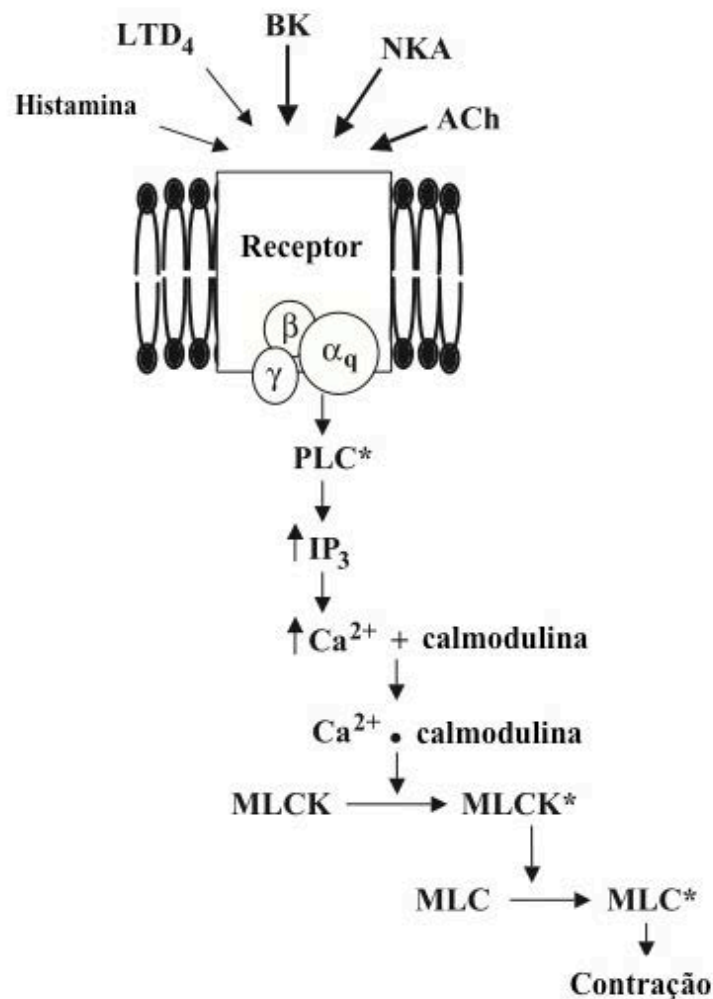


Figura 8. Representação esquemática da contração do músculo liso das vias aéreas induzida por agonistas. Os asteriscos indicam formas ativadas das moléculas. LTD4 = leucotrieno D4; BK = bradicinina; NKA = neurocinina; ACh = acetilcolina; PLC = fosfolipase C; IP<sub>3</sub> = trifosfato de inositol; Ca = cálcio; MLCK = cadeia leve da miosina quinase MLCK\* = cadeia leve da miosina ativada; MLC = cadeia leve da miosina; MLC\* = cadeia leve da miosina ativada. Adaptado de SHORE; MOORE, 2002.

O músculo liso das vias aéreas também possui muitos receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos. A adrenalina promove o relaxamento do músculo liso das vias aéreas, através da ligação com receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos (β<sub>2</sub>AR), acoplados a proteínas G<sub>s</sub>, que ativam a adenilato ciclase, resultando em aumento de 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e consequente ativação da proteína-quinase A (PKA), e modificação das concentrações de Ca<sup>++</sup> e K<sup>+</sup> intracelulares. Outros agonistas dos receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos, como o Isoproterenol (Iso), são utilizados para o relaxamento imediato do músculo liso das vias aéreas nos ataques de asma, sendo medicamentos broncodilatadores (GALLOS *et al*, 2008; BLACK *et al*, 2012). Esses

agonistas aumentam o cAMP intracelular ([cAMP]<sub>i</sub>) e estimulam as proteínas-quinases dependentes de cAMP (PKA), que, por sua vez, fosforilam e inativam a quinase de cadeia leve de miosina, promovendo o relaxamento do músculo liso das vias aéreas (BORTOLOTTI; CONSOLIM-COLOMBO, 2009; BLACK *et al*, 2012) (Figura 9). De acordo com Ozier *et al* (2011), a menor liberação de mediadores que relaxam a musculatura lisa pode resultar na hiper-responsividade da asma, assim como a maior liberação de mediadores que a contraem.

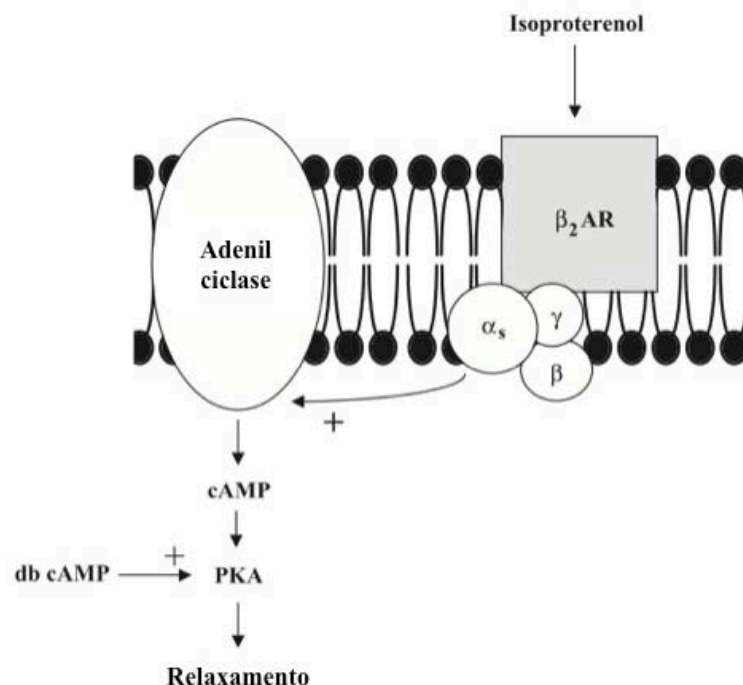


Figura 9. Representação esquemática do relaxamento do músculo liso das vias aéreas induzida por isoproterenol. β<sub>2</sub>AR = Receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; db cAMP = dibutryl monofosfato de adenosina cíclico; PKA = proteína quinase A. Adaptado de SHORE; MOORE, 2002.

Evidências correntes favorecem uma ligação de causa e efeito entre a inflamação e a responsividade alterada do músculo liso das vias aéreas na asma (SHORE; MOORE, 2002; ANDERSON, 2010), uma vez que as propriedades contráteis são moduladas pelos mediadores inflamatórios secretados pelos leucócitos e pelo músculo liso das vias aéreas (ELLIS; UNDEM, 1994).



Entre as citocinas inflamatórias produzidas em maior quantidade na asma e que regulam a contratilidade do músculo liso das vias aéreas estão a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (SHORE, 2002; BLACK *et al*, 2012). Além de serem agentes quimiotáticos para vários leucócitos na asma (ROSENWASSER, 1998; TRIFILIEFF *et al*, 2002; DRAGON *et al*, 2007; TOWNLEY; HORIBA, 2003; CHAI *et al*, 2011), a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  agem diretamente no músculo liso das vias aéreas, fazendo com que este contraia mais facilmente e relaxe menos facilmente (SHORE; MOORE, 2002; TOWNLEY; HORIBA, 2003; BLACK *et al*, 2012). Foi demonstrado por exemplo que a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  aumentam a reatividade do músculo a vários indutores diretos da hiper-responsividade na asma, como a metacolina (TOWNLEY; HORIBA, 2003), a bradicinina (CHUNG; BARNES, 1999; SHORE; MOORE, 2002), o carbachol, a trombina (SHORE; MOORE, 2002) e a acetilcolina (SHORE; MOORE, 2002) e diminuem a resposta a agonistas dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (TOWNLEY; HORIBA, 2003). A diminuição da resposta de relaxamento ao isoproterenol *in vitro* se dá pelo desacoplamento dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos das proteínas G<sub>s</sub> (SHORE; MOORE, 2002), principalmente pela IL-1 $\beta$ . O TNF- $\alpha$  sozinho não suprime o relaxamento ao isoproterenol, mas o tratamento com TNF- $\alpha$  simultaneamente com a IL-1 $\beta$ , ambos em concentrações em que sozinhos não tem efeito, as quais são similares às encontradas no lavado broncoalveolar de asmáticos, suprime o relaxamento induzido por isoproterenol, o que pode representar consequências funcionais (SHORE; MOORE, 2002).

Entre os mediadores lipídicos que têm sua liberação aumentada na asma e são agonistas contráteis do músculo liso das vias aéreas, estão as prostaglandinas, os isoprostanos, os tromboxanos da série 2 e os leucotrienos da série 4 (LIU *et al*, 1990; ELLIS; UNDEM, 1994; ALLEN *et al*, 2006; TODO-BOM; PINTO, 2006; OZIER *et al*, 2011; RUBIN *et al*, 1987; SOLWAY; FREDBERG, 1997; NOBLE *et al*, 2012; PASCOE *et al*, 2012), sendo que os leucotrienos parecem ser os principais mediadores responsáveis pelas alterações encontradas na resposta do músculo liso das vias aéreas (BARALDI *et al*, 2003; LEVY, 2005; JAMES *et al*, 2007; FOSTER *et al*, 2013; MONTUSCHI; PETERS-GOLDEN, 2010; BARNES, 2011; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010; SINGH *et al* 2010; OKUNISHI, PETERS-GOLDEN, 2011). Há crescente evidência do papel do leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) na contração do músculo liso das vias aéreas (WATANABE *et al*, 2009; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010). O

LTB<sub>4</sub> se liga a receptores específicos no músculo liso (WATANABE *et al*, 2009), e parece estar relacionado a hiper-responsividade em modelos animais de asma (HALLSTRAND; HENDERSON, 2010). Concentrações elevadas de LTB<sub>4</sub> têm sido demonstradas em asmáticos, nas crises de exacerbação aguda (VACHIER *et al*, 2005; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010), promovendo principalmente a contração do músculo liso das vias aéreas (LEVY, 2005). Os tromboxanos A<sub>2</sub> e as prostaglandinas da série D<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> também são broncoconstritores, iniciando a contração do músculo liso das vias aéreas (DAHLÉN *et al*, 1986; OZIER *et al*, 2011; CYPHERT *et al*, 2012; YIN *et al*, 2009; ALLEN *et al*, 2006; HOLGATE, 2012). A concentração de PGE<sub>2</sub> também aumenta na asma. No entanto, vários estudos tem sugerido que a PGE<sub>2</sub> retrai a inflamação e exerce efeitos broncoprotetores (PEEBLES *et al*, 2002; PEEBLES *et al*, 2005; YIN *et al*, 2009). Foi demonstrado por exemplo que a PGE<sub>2</sub> aumenta o cAMP nas células musculares lisas das vias aéreas (BLACK *et al*, 2012), apresentando um efeito broncodilatador (DAMERA *et al*, 2009). A utilização de PGE<sub>2</sub> inalada tem sido testada em asmáticos, e parece reduzir a constrição brônquica (LIU *et al*, 2012). Os isoprostanos, derivados da oxidação não enzimática do AA, mantem os eventos inflamatórios e aumentam a hiper-responsividade brônquica a uma variedade de estímulos (BARNES *et al*, 1998; JANSSEN, 2000; YIN *et al*, 2009).

#### 2.2.4 Alterações na parede das vias aéreas em asmáticos e na complacência pulmonar

A liberação excessiva de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios observada na indução experimental de asma por exposição a um alérgeno poderiam resultar em alterações estruturais nas células residentes das vias aéreas (RICCIARDOLO *et al*, 2003; FIXMAN *et al*, 2007). Nas vias aéreas de asmáticos são observadas, por exemplo, aumento da espessura das células musculares lisas, por hipertrofia e hiperplasia (MARTIN *et al*, 2000), aumento do número de miofibroblastos e deposição de colágeno na lâmina reticular (JAMES *et al*, 2002), e aumento do número de vasos (MARTIN *et al*, 2000) e do número de células caliciformes no epitélio das vias aéreas (CHUNG; BARNES, 1999; SIDDIQUI

*et al*, 2010). Essas modificações estruturais nas células da parede das vias aéreas são chamadas de remodelamento (HOMER; ELIAS, 2005; SIDDIQUI *et al*, 2010) e estão relacionadas com o aumento da espessura das paredes dos bronquíolos e com a deposição de muco na luz das vias aéreas/bronquíolos, sendo que ambos podem contribuir para o estreitamento das vias aéreas de asmáticos (WIGGS *et al*, 1992; WIGGS *et al*, 1997).

Dessa forma, embora a hiper-responsividade das vias aéreas resulte de alterações na contração do músculo liso das vias aéreas, também existem algumas evidências de que ela também possa ser causada pelas alterações estruturais (LOCKE *et al*, 2007; PARÉ *et al*, 2007; SIDDIQUI *et al*, 2010). Por exemplo, o aumento de massa do músculo liso das vias aéreas aumenta a hiper-responsividade (FIXMAN *et al*, 2007; PLANT *et al*, 2012), pois eleva a força de contração.

Independentemente do grau de contração do músculo liso das vias aéreas, o aumento da espessura do músculo para o lado luminal também aumenta o estreitamento dos bronquíolos, pois o tecido adicional é um fator que ocupa o espaço e reduz a área luminal. O espessamento da parede externa ou área adventícia resultante do remodelamento também pode aumentar o estreitamento por razões geométricas (FIXMAN *et al*, 2007).

As consequências dessas alterações estruturais são consistentes com a diminuição da função das vias aéreas em asmáticos (WARD *et al*, 2001; FIXMAN *et al*, 2007). A metaplasia das células caliciformes e o aumento glandular podem explicar o excesso de muco associado com a asma (CARROLL *et al*, 2002; FIXMAN *et al*, 2007). O muco, juntamente com proteínas extravasadas e células inflamatórias pode causar um entupimento luminal das vias aéreas. Além disso, a obstrução das vias aéreas com esse fluido rico em proteína contribui para o rompimento da função surfactante, o que aumenta a obstrução luminal das vias aéreas (FIXMAN *et al*, 2007). A redução da função surfactante pode reduzir a complacência pulmonar, que é a capacidade do pulmão de se distender. Essa diminuição na distensibilidade (ou complacência) pulmonar em asmáticos foi demonstrada e está relacionada com edema e inflamação (GRIGORAS *et al*, 2012; KELLY *et al*, 2012).

De acordo com Locke *et al* (2007), a fibrose das vias aéreas intensifica a hiper-responsividade em asmáticos. Em asmáticos a deposição de colágeno e fibronectina na membrana basal subepitelial é uma característica bem estabelecida (BREWSTER *et al*, 1990; PASTERNYK *et al*, 2012). Essa fibrose subepitelial,

aumenta o estreitamento das vias aéreas (WIGGS *et al*, 1997; MARTIN *et al*, 2000; JAMES *et al*, 2002) e pode contribuir para a redução da complacência pulmonar, pois promove um endurecimento das vias respiratórias e redução dos efeitos dos movimentos respiratórios cíclicos no alongamento do músculo liso associado a esses movimentos (SOLWAY; FREDBERG, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos adultos (3-4 meses, 220±30g) foram obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro ratos por gaiola) em sala com temperatura de 23 °C e com 55% de umidade relativa, sob um ciclo claro/escuro de 12/12h, recebendo ração animal *ad libitum*, contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios (NUVILAB® CR1, Nuvital nutrientes Ltda, Curitiba-PR) e tendo livre acesso à água filtrada. A composição de ácidos graxos da ração foi de 1,3% de C12:0 (ácido dodecanoico ou láurico), 13,7% de C16:0 (ácido hexadecanoico ou palmítico), 2,4% de C18:0 (ácido octadecanoico ou esteárico), 20,0% de C18:1 n-9 (ácido 9-octadecenoico ou oleico), 56,0% de C18:2 n-6 (ácido 9,12-octadecadienoico ou linoleico), 6,0% de C18:3 n-3 (ácido 9,12,15-octadecatrienoico ou  $\alpha$ -linolênico), 0,3% de C20:4 n-6 (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico ou araquidônico), 0,2% de C20:5 n-3 (ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico), determinada por HPLC, por Schiessel, 2011. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as exigências estabelecidas no “*Guide for the care and use of experimental animals*” (Canadian Council on Animal Care), certificado no protocolo número 468 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente separados em quatro grupos: controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (OP), asmático (A), e asmático suplementado com óleo de peixe (AOP). Esses animais foram submetidos aos protocolos de suplementação e indução à asma, descritos nos itens 3.3 e 3.4. Vinte

e quatro horas após a realização do último procedimento de indução à asma, descrito no item 3.4.2, os animais receberam injeção intraperitoneal de tiopental (20 mg/kg) como anestésico (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), e injeção de cloreto de potássio (2 mmol/kg) para a eutanásia (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Para os ensaios descritos nos itens 3.5, 3.6, 3.10, 3.11 e 3.12 foram realizados, no mínimo, 3 experimentos, com o total de 16 animais para cada experimento, utilizando o mesmo grupo de animais para coleta de material. Para os ensaios descritos nos itens 3.7, 3.8 e 3.9 foram realizados 3 experimentos para cada ensaio, separadamente.

### 3.3 SUPLEMENTAÇÃO

Os animais dos grupos OP e AOP receberam, durante 21 dias consecutivos (Quadro 1), 1g de óleo de peixe/kg de massa corpórea por via oral, na qual o óleo era gentilmente colocado, utilizando-se uma micropipeta. Os grupos C e A não receberam nenhum suplemento, mas foram manipulados da mesma forma, para evitar possíveis alterações ocasionadas pela manipulação. O óleo de peixe administrado era procedente da Herbarium® e a composição de ácidos graxos do óleo de peixe, que foi determinada por HPLC por Yamaguchi, 2012, era de 3,4% de C12:0 (ácido dodecanoico ou láurico), 9,8% de C14:0 (ácido tetradecanoico ou mirístico), 25,3% de C16:0 (ácido hexadecanoico ou palmítico), 2,1 de C18:0 (ácido octadecanoico ou esteárico), 6,5% de C16:1 n-7 (ácido 9-hexadecenoico ou palmitoleico), 10,2% de C18:1 n-9 (ácido 9-octadecenoico ou oleico), 2,0% de C18:2 n-6 (ácido 9, 12-octadecadienoico ou linoleico), 0,7% de C18:3 n-3 (ácido 9,12,15-octadecatrienoico ou  $\alpha$ -linolênico), 0,9% de C20:4 n-6 (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico ou araquidônico), 20,2% de C20:5 n-3 (ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico), 18,8% de C22:6 n-3 (ácido 4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenoico).

### 3.4 INDUÇÃO DE UM QUADRO INFLAMATÓRIO PULMONAR SEMELHANTE AO DA ASMA EM ANIMAIS INICIALMENTE SADIOS

### 3.4.1 Sensibilização à ovalbumina (OVA)

Para a sensibilização com ovalbumina (OVA), os ratos dos grupos A e AOP receberam duas injeções subcutâneas, em dias separados (conforme o quadro 1), de 1,0 mL de PBS (solução aquosa de NaCl 0,80%, KCl 0,02%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,012% e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,23%, pH 7,4), contendo 1,0 mg de OVA (Sigma®) adsorvida em 200 mg de hidróxido de alumínio. A sensibilização foi iniciada com a primeira injeção no quinto dia após o início da suplementação, e a segunda injeção foi realizada no décimo segundo dia (Quadro 1). Esse procedimento mimetiza a sensibilização do indivíduo ao alérgeno, com a indução da geração de IgE específica à OVA. Nos ratos dos grupos C e OP foi injetada uma suspensão de hidróxido de alumínio em PBS (200mg/mL) sem OVA, de maneira semelhante à realizada para os grupos A e AOP.

Quadro 1 – Representação do período experimental, com a indicação dos procedimentos realizados a cada dia, de suplementação, sensibilização à ovalbumina (OVA) e desafio alérgico pulmonar.

Dias																					
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
DI	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU	SU
					SE1							SE2							DA	DA	DA

DI = distribuição aleatória dos animais por grupo; SU = suplementação; SE1 = primeira injeção para sensibilização à ovalbumina; SE2 = segunda injeção para sensibilização à ovalbumina; DA = desafio alérgico pulmonar.

### 3.4.2 Desafio alérgico pulmonar com OVA

Uma semana após o reforço da sensibilização, todos os ratos sensibilizados à OVA (A e AOP) foram expostos a aerossol de OVA 5% em PBS (20 mL desolução/hora) em uma câmara de 3 dm<sup>3</sup>, durante 30 min diários, por 3 dias consecutivos (Quadro 1). Os ratos não sensibilizados (C e OP) foram expostos a aerossol de PBS sem OVA, em condição semelhante à dos ratos sensibilizados.

Esse procedimento mimetiza o desafio alergênico do indivíduo já sensibilizado. Este modelo é baseado no protocolo descrito por Schuster *et al* (2000).

### 3.5 COLETA DO LBA E CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS

Foi feita traqueostomia em região proximal da traqueia dos animais para coleta do lavado broncoalveolar. Uma cânula foi inserida na traqueia através do orifício formado, e acoplada a uma seringa de 5 mL. Foram gentilmente injetados 5 mL de PBS na traqueia para lavagem dos pulmões, e a seguir o lavado foi gentilmente aspirado com a seringa e depositado em tubos para centrifuga. Esse procedimento foi realizado por dez vezes consecutivas para cada animal, sendo que o volume de lavado recuperado foi de aproximadamente 90-95% do que foi injetado. Os tubos, contendo lavado broncoalveolar de cada animal, foram mantidos em banho de gelo até a finalização da coleta. A seguir, o lavado broncoalveolar foi centrifugado por 8 min a 290 *g* e 4°C, para formação do *pellet* de células. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em 500 µL de PBS. Alíquotas dessa suspensão de células foram utilizadas para contagem do número total de células e contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar.

O número total de células foi determinado por análise da suspensão celular por microscopia de luz (aumento de 400 x), usando o corante Azul de Trypan (0,5 mg/mL em PBS), para exclusão de células inviáveis, e uma câmara de Neubauer *Improved*. Para contagem diferencial das células presentes no LBA, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular do LBA foi dispersa em lâmina de vidro. Após a secagem do material na lâmina (cerca de 24 h, em temperatura ambiente), foi realizada a coloração de May-Grünwald Giemsa. O material da lâmina foi tratado com o corante de May-Grünwald (Newprov®) por 40 s. A seguir a lâmina foi lavada com água destilada por 1 min, e o material foi tratado com Giemsa (Newprov®) na concentração de 50 mg/mL em água destilada, durante 2 min. Após a secagem das lâminas, foram contadas manualmente 200 células por lâmina, utilizando-se microscopia de luz (microscópio Leica DM LS2) com aumento de 100 x. A porcentagem das diferentes populações de células foi determinada, sendo estas



classificadas com base em suas propriedades de coloração e morfológicas em: eosinófilos, macrófagos, linfócitos ou neutrófilos. Foram feitas fotomicrografias das lâminas no mesmo microscópio com aumento de 100 x e câmera acoplada Leica DFC 300FX com aumento de 10 x.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ADESÃO E FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM MICROPLACAS

#### 3.6.1 Isolamento dos macrófagos alveolares

Após a contagem do número total de células obtidas do LBA, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL. Foram plaqueados 100µL do LBA de cada grupo em poços separados de uma microplaca de 96 poços, em triplicata para cada ensaio (avaliação da capacidade fagocitária e adesão, descritos nos tópicos 3.6.2 e 3.6.3) que seria realizado. Esta placa foi incubada por 1 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, restando apenas os macrófagos aderidos à placa.

#### 3.6.2 Determinação da capacidade de adesão de macrófagos aderidos à microplaca pela coloração com Giemsa

As células aderidas à microplaca foram fixadas pela incubação, por 10 min, com 100µL de metanol (P.A.) por poço da placa. O metanol sobrenadante foi desprezado e a placa foi deixada por 10 min em estufa a 36°C para secar o resíduo metanólico. Foram então adicionados 100µL de solução de Giemsa (1 mg/mL em metanol), sendo esta deixada agir sobre as amostras por 10 min. O sobrenadante foi então descartado e cada poço da placa foi lavado com água destilada. O corante restante na placa que ficou impregnado sobre os macrófagos das amostras, foi

então solubilizado com 200 $\mu$ L de metanol. A solução resultante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro em comprimento de onda correspondente a 550 nm (microplate reader Bio-rad- Benchmark). Esse ensaio é adaptado da técnica de Rosen e Gordon (1987).

### 3.6.3 Determinação da capacidade fagocitária de macrófagos alveolares

Após a lavagem da placa com os macrófagos aderidos, foram adicionados 100 $\mu$ L de meio de cultura e 10 $\mu$ L de solução de zimosan não opsonizado ( $1 \times 10^8$  partículas/mL), corado com vermelho neutro, para incubação por 30 min. Depois foram adicionados 200  $\mu$ L de fixador (4 mL/100 mL de formaldeído, 2g/100 mL de cloreto de sódio, 1g/100 mL de acetato de cálcio) para incubação por mais 30 min. Então o sobrenadante foi desprezado, e a placa foi lavada com PBS e centrifugada a 290 g, por 5 min, a 4°C (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). O sobrenadante foi novamente desprezado e, a seguir, foram adicionados 200 $\mu$ L de solução de extração (10 mL de ácido acético glacial + 40 mL de etanol + 60 mL de água destilada) para nova incubação por 30 min. As absorbâncias foram obtidas em leitor de microplacas (Bio-rad - Benchmark) a 550 nm. Esse ensaio é adaptado do método descrito por Pipe *et al* (1995).

## 3.7 DETERMINAÇÃO DA RESPONSIVIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL A ACETILCOLINA E ISOPROTERENOL

Para determinação da resposta do músculo liso das vias aéreas foi utilizada uma medida clássica das alterações funcionais do músculo liso isolado do anel de traqueia. A traqueia foi exposta para a remoção de um segmento. O segmento isolado da traqueia foi mantido em solução de Ringer Normal (NaCl 110 mM, KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> 10 mM (TRIS 10 mM), glicose 1 mM- pH 7,4), pré-gaseado com O<sub>2</sub> puro, para a dissecação dos anéis de traqueia.

Um anel de traqueia foi cuidadosamente dissecado. A seguir, o anel de traqueia foi cortado no eixo mediano da cartilagem, de modo que o músculo liso que se insere bilateralmente nas extremidades laterais dos anéis cartilagosos da traqueia fosse mantido intacto. As extremidades mediais cartilaginosas foram fixadas com grampos; uma extremidade foi ligada a um transdutor de força MLT0420 (AD Instruments, Bella Vista, Austrália) e a outra a um braço móvel, para ajustar o comprimento da preparação (modelo 300B, Cambridge Technologies). Esta preparação foi mantida em um banho a 37°C de 10 mL de solução de Ringer Normal continuamente gaseados com O<sub>2</sub> puro para a detecção da contração máxima ou do relaxamento. A tensão foi avaliada usando um registrador gráfico (Beckman type RM). A preparação foi estendida até 120% do seu comprimento. A contração máxima foi obtida através da adição de acetilcolina (150 µL) ao banho. Após a contração máxima, o relaxamento foi induzido pela adição de isoproterenol (100 µL) ao banho. Este protocolo foi utilizado para todos os grupos estudados. Os valores de força e relaxamento foram expressos em miliNewtons (mN).

### 3.8 DETERMINAÇÃO DA COMPLACÊNCIA PULMONAR ESTÁTICA

Os animais foram traqueostomizados para inserção de uma cânula (14 gauge) a 1 cm de profundidade, a qual foi adaptada a um transdutor de pressão (AD instruments Bella Vista, Australia). Para medir a pressão intrapulmonar, o pulmão de cada animal foi inflado de 2 em 2 mL de ar até um volume total de 14 mL, e a pressão foi registrada usando um conversor AD/DA conectado a um computador (Power Lab System, AD instruments). A complacência pulmonar estática foi determinada como  $C[st] = DV/DP$ , onde DV é a variação do volume de ar injetado no pulmão e DP é a variação da pressão medida para cada animal.

### 3.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS DIMENSÕES DA PAREDE E DA OBLITERAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Os animais foram toracotomizados e os pulmões foram removidos e fixados imediatamente em fixador Karnovsky (2 mL/100mL de paraformaldeído e 2,5mL/100 mL de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2). Os tecidos pulmonares foram embebidos em parafina e cortados em finas secções (~3 µm de espessura, obtidas a cada 100 µm); as secções foram desparafinizadas, reidratadas e coradas com hematoxilina/eosina (HE), para avaliação morfológica dos bronquíolos. Cada secção foi analisada em microscópio de luz (Axio-Imager Z2 Zeiss) conectado a um computador e as medidas morfológicas foram obtidas com o Programa MetaSystem. Todas as vias aéreas que foram cortadas em secções transversais nas quais a razão entre o diâmetro mais curto e o diâmetro mais longo era  $> 0,6$  foram examinadas. As medidas incluíram: 1) perímetro interno das vias aéreas ( $P_i$ ) e área interna ( $A_i$ ); 2) perímetro muscular externo ( $P_{me}$ ) e área muscular externa ( $A_{me}$ ); 3) perímetro externo das vias aéreas ( $P_e$ ) e área externa ( $A_e$ ), como descrito por Sasaki *et al* (1996). A área da parede interna ( $W_{Ai}$ ), a área da parede adventícia ( $W_{Ao}$ ) e a área total da parede ( $W_{AT}$ ) foram calculadas como  $W_{Ai} = A_{me} - A_i$ ,  $W_{Ao} = A_e - A_{me}$ , e  $W_{AT} = A_e - A_i$ . O espessamento da parede das vias aéreas foi calculado como  $W_{AT}/A_i^*$ , onde  $A_i^*$  é a área luminal ideal da via relaxada, calculada como  $A_i^* = P_i^2/4\pi$ , usada para normalizar a área da parede das vias aéreas e minimizar diferenças relacionadas ao tamanho dos bronquíolos. A inflamação foi avaliada pela porcentagem de área interna das vias aéreas obliterada por muco.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF- $\alpha$ E IL-1 $\beta$ NO TECIDO PULMONAR

Após a coleta do LBA, os ratos foram toracotomizados. O lobo inferior direito dos pulmões de cada animal foi removido, lavado em PBS e congelado em nitrogênio líquido antes de ser armazenado a -80°C para posterior determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os pulmões foram descongelados imediatamente antes da homogenização em PBS (100 mg de tecido/mL de PBS), utilizando-se um micro-homogenizador elétrico (GGS 27, Bosch). Os homogenatos de tecido

pulmonar foram centrifugados a 5000 *g* e 4°C por 10 min (centrífuga Eppendorf modelo 5810R) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  utilizando-se sistemas de ELISA comercialmente disponíveis (Rat TNF alpha ELISA Ready-SET- Go!®, e Rat IL-1 $\beta$  Ready-Set-Go!®, eBioscience, San Diego, CA, EUA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O protocolo consistiu em adicionar 100  $\mu$ L/escavação do anticorpo de captura (Capture Ab) previamente diluído conforme instruções do fabricante em tampão de revestimento, incluído no conjunto do sistema, a uma placa de 96 escavações (Coat Corning Costar 9018 ELISA, Lowell, MA, EUA), e incubar durante a noite a 4° C. Após esse período, a placa foi lavada por 3 (IL-1 $\beta$ ) ou 5 vezes (TNF- $\alpha$ ) com 250  $\mu$ L/escavação de tampão de lavagem (0,05 mL/100 mL de tween-20 emPBS), utilizando-se uma lavadora automática de placas de ELISA (ELX50 Microplate Strip Washer, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA). A seguir foram adicionados à placa 200  $\mu$ L/escavação de diluente do ensaio fornecido pelo fabricante e a placa foi incubada no escuro por 1 h em temperatura ambiente. Os padrões de TNF- $\alpha$  foram diluídos em diluente de ensaio, de acordo com as instruções, sendo que o padrão com maior concentração era de 2000 pg/mL e o padrão com menor concentração (que corresponde a menor concentração detectável) era de 16 pg/mL, obtendo-se 8 concentrações diferentes. Os padrões de IL-1 $\beta$  também foram diluídos no diluente de ensaio, sendo o padrão de maior concentração de 5000 pg/mL e o de menor concentração de 39 pg/mL. A placa foi lavada novamente, da mesma forma que na lavagem anterior. Os padrões foram adicionados às escavações apropriadas da placa de cada ensaio nas diferentes concentrações, assim como as amostras obtidas dos homogenatos (100  $\mu$ L/escavação, em duplicata), e a placa foi incubada no escuro por 2 h em temperatura ambiente. Nessa etapa, o TNF- $\alpha$  ou a IL-1 $\beta$  presentes nos padrões ou nas amostras se liga ao anticorpo de captura. A placa foi lavada novamente da mesma forma já descrita e foram adicionados 100  $\mu$ L/escavação do anticorpo de detecção (Detection Ab), diluído conforme as instruções em diluente de ensaio. A placa foi incubada no escuro por 1 h (nessa etapa o anticorpo de detecção se liga ao TNF- $\alpha$  ou a IL-1 $\beta$  já ligados ao anticorpo de captura) e lavada novamente conforme já descrito. Foram adicionados à placa 100  $\mu$ L/escavação da enzima Avidina-HRP (Detection enzyme avidin-HRP) em diluente de ensaio, e a placa foi incubada no escuro por 30 min em temperatura ambiente.

Nessa etapa, a enzima se liga ao anticorpo de detecção. Após esse período, a placa foi lavada por 3 vezes com 250  $\mu\text{L}$ /escavação de tampão de lavagem (0,05 mL/100 mL tween-20 em PBS), utilizando-se a lavadora de placas de ELISA. A seguir, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /escavação da solução do substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) (TMB Solution) e a placa foi incubada por 15 min. A reação enzima-substrato forma, assim, uma coloração, que é diretamente proporcional à concentração da citocina que está sendo analisada (TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ ). Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$ /escavação de solução 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a fim de bloquear a reação, e a placa foi lida a seguir, em 450 nm em leitor de microplacas (Microplate Reader EPOCH, Bio-Tek, Winooski, VT, EUA).

### 3.11 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE EICOSANOIDES NO TECIDO PULMONAR

Os procedimentos foram realizados utilizando sistemas comerciais de imuno-ensaio enzimático (*Enzyme Immunoassay* – EIA), de acordo com as instruções do fabricante, para a  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{TXB}_2$ , 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA),  $\text{LXA}_4$  (Oxford Biomedical Research, Oxford, Reino Unido) e  $\text{RvE}_1$  (MyBioSource, San Diego, CA, EUA).

Após a coleta do LBA, os ratos foram toracotomizados. O lobo inferior esquerdo dos pulmões de cada animal foi removido, lavado em PBS e congelado em nitrogênio líquido antes de ser armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ . Os pulmões foram descongelados para pesagem de 25 mg de tecido pulmonar. O tecido foi homogeneizado (micro-homogenizer IKA T10 basic, Ultra Turrax) na concentração de 25 mg/mL em PBS, pH 7,4, contendo 1 mM EDTA e 10  $\mu\text{M}$  de indometacina, para análise de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ ,  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{LXA}_4$  e  $\text{RvE}_1$ . Para análise de 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , o tecido foi homogeneizado em PBS, pH 7,4, contendo 1mM EDTA, e 0,005 g/100mL de BHT (*Butylated hydroxytoluene* - hidróxido de tolueno butilato) como antioxidante. Os homogenatos foram centrifugados a 5000 g e  $4^\circ\text{C}$  por 10 min (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). O sobrenadante diluído (1:50 para análise de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{LTB}_4$  e 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , 1:500 para  $\text{TXB}_2$  e 1:5 para  $\text{LXA}_4$  e  $\text{RvE}_1$ ) em tampão de ensaio fornecido

pelo fabricante, ou os padrões diluídos para concentrações conhecidas, foram incubados juntamente com o conjugado eicosanoide-acetilcolinesterase e com o anticorpo de detecção específico do eicosanoide em placas de 96 escavações bloqueadas e pré-revestidas com anticorpo de captura (imunoglobulina G de rato). O anticorpo específico para o eicosanoide forma um complexo tanto com o eicosanoide livre presente nas amostras ou nos padrões, quanto com o eicosanoide ligado a acetilcolinesterase, e se liga ao anticorpo de captura. As concentrações do homogenato foram testadas anteriormente para cada ensaio para ficarem dentro da curva-padrão do respectivo eicosanoide. A incubação foi de 60 min em temperatura ambiente para  $\text{PGE}_2$ , de 18 h a 4° C para  $\text{TXB}_2$  e 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , *overnight* a 4°C para  $\text{LTB}_4$ , e 1 h em temperatura ambiente para  $\text{LXA}_4$  e  $\text{RvE}_1$ . Após o período de incubação, as placas foram lavadas por 5 vezes, conforme recomendado nos ensaios de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ , 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{LTB}_4$  e  $\text{RvE}_1$  ou por 3 vezes para o ensaio de  $\text{LXA}_4$ , com o tampão de lavagem proveniente do sistema comercial. A seguir as placas foram incubadas com o substrato para a enzima (acetilcolinesterase ou *horse-radish peroxidase* - HRP) pelo tempo recomendado para cada ensaio (que variava de 30 a 120 min), no escuro e em temperatura ambiente. O produto da reação enzima-substrato forma uma coloração amarela (ou azul, que depois que a solução de parada é adicionada se torna amarela, no caso do ensaio para  $\text{LXA}_4$ ). A densidade óptica das amostras foi determinada em 405 nm para  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ ,  $\text{LTB}_4$  e 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ou 450 nm para  $\text{RvE}_1$ , ou 650 nm para  $\text{LXA}_4$ , em um leitor de microplacas (Multiskan EX, Thermo Labsystems, Vantaa, Finlândia) e as concentrações foram calculadas a partir da curva-padrão, de acordo com o protocolo do sistema. A densidade óptica é proporcional à concentração de eicosanoide ligado a acetilcolinesterase e inversamente proporcional à concentração de eicosanoide livre nas amostras. As concentrações foram corrigidas pela massa de tecido pulmonar (mg) nas amostras de acordo com as diluições feitas a partir do sobrenadante dos homogenatos.

### 3.12 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO PULMONAR

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes no tecido pulmonar foi feita a análise de AG utilizando-se cromatografia gasosa (CG). Os ácidos graxos (AG) foram analisados nos lipídios totais dos homogenatos pulmonares. O princípio fundamental da separação de AG por CG é que os diferentes AG se tornam voláteis a temperaturas diferentes, dependendo do comprimento da cadeia (número de carbonos), e do número e da posição das insaturações na molécula. Além da diferença da temperatura de ebulição, a separação também é feita pela diferente interação dos AG com o revestimento da coluna cromatográfica.

Após a coleta do LBA, os ratos foram toracotomizados. O lobo inferior esquerdo dos pulmões de cada animal foi removido, lavado em PBS e congelado em nitrogênio líquido antes de ser armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente descongelado para homogeneização. Foram homogeneizados 100 mg de tecido pulmonar em 0,8 mL de NaCl 0,9% (micro-homogenizer IKA T10 basic, Ultra Turrax). Os lipídios totais foram extraídos do pulmão homogeneizado da seguinte forma: foram adicionados 5 mL de clorofórmio:metanol (2:1) e BHT (50 mg/L) como um antioxidante; a seguir essa mistura foi centrifugada a 5000 g por 10 min (centrífuga Eppendorf modelo 5810R); a fase sobrenadante formada foi descartada e a fase infranadante (lipídica) foi seca sob atmosfera de azoto; os lipídios foram dissolvidos novamente em 0,5 mL de tolueno. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG), foram formados por incubação com metanol que continha 2 mL/100mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. Depois do resfriamento dos tubos, as amostras foram neutralizadas com uma solução de  $\text{KHCO}_3$  0,25 mol/L de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 0,5 mol/L. Os EMAG foram extraídos pela adição de 1 mL de hexano, centrifugação a 4000 g por 2 min (centrífuga Eppendorf modelo 5810R); a fase sobrenadante, que contém os EMAG, foi seca em atmosfera de azoto. O procedimento de esterificação metílica dos ácidos graxos serve para reduzir a taxa do ponto de ebulição, permitindo a separação de uma variedade de AG a uma temperatura moderada. A seguir os EMAG foram redissolvidos em 75  $\mu\text{L}$  de hexano e separados por meio de cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa foi realizada num cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna BPX-70 (30 m x 0,22 milímetros x 0,25 mM). A temperatura de entrada era de  $300^{\circ}\text{C}$ . A temperatura do forno foi inicialmente de  $115^{\circ}\text{C}$  e foi mantida durante 2 min após a injeção. A temperatura do forno foi programada para aumentar para  $200^{\circ}\text{C}$  à taxa de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  para manter a  $200^{\circ}\text{C}$  durante 16 min e aumentar a  $240^{\circ}\text{C}$  à



taxa de 60° C/min para manter a 240° C durante 2 min. O tempo total de execução foi de 29 min. Hélio (He) foi utilizado como gás de transporte. Os EMAG foram detectados utilizando um detector de ionização de chama, em uma temperatura de 300° C. O instrumento foi controlado e os dados foram coletados, através da utilização do software HPChemStation (Hewlett-Packard). Os EMAG foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de padrões de ácidos graxos autênticos executados anteriormente. Os padrões utilizados para a calibração dos tempos de retenção foram: uma mistura, contendo EMAG de 12:0 (1 mg/mL), 14:0 (2 mg/mL), 16:0 (1 mg/mL), 16:1 n-7 (2 mg/mL), 18:0 (1 mg/mL), 18:1 n-9 (2 mg/mL), 18:2 n-6 (1 mg/mL), 18:3 n-6 (1 mg/mL), 18:3 n-3 (2 mg/mL), 20:0 (2 mg/mL), 20:1 n-9 (1 mg/mL), 20:2 n-6 (1 mg/mL), 20:3 n-6 (1 mg/mL), 20:4 n-6 (2 mg/mL), 22:0 (2 mg/mL), 24:0 (1 mg/mL), 24:1 n-9 (2 mg/mL), e EMAG 14:0, 16:0, 16:1 n-7, 18:0, 18:1 n-9, 18:2 n-6, 18:3 n-3, 20:1 n-9, 20:4 n-6, 22:1 n-9, 20:5 n-3, 22:5 n-3 e 22:6 n-3 do óleo de savelha (1 mg/mL), todos da Sigma (St. Louis, Missouri, EUA). Os coeficientes de variação intra-ensaio para a análise de EPA e DHA na forma de ésteres metílicos foram de 3% e 2%, respectivamente. Os coeficientes de variação para a análise inter-ensaio de EPA e DHA na forma de ésteres metílicos foram de 5% e 2,5%, respectivamente.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre grupos foram realizadas empregando-se análise de variância ANOVA *one-way*, seguido de pós-teste de Tukey. Para análise dos dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As análises foram conduzidas pelo software Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS NO LBA

O número total de células do lavado broncoalveolar (LBA) para os grupos experimentais estão apresentados na Tabela 1, juntamente com a média do número de cada uma dessas populações de células encontradas para cada grupo experimental. No grupo de animais asmáticos (A) o número total de células no LBA foi significativamente maior do que nos animais do grupo controle (C) não asmáticos, indicando maior infiltração de leucócitos, que é uma característica da inflamação asmática. A suplementação com óleo de peixe suprimiu essa infiltração de células nos animais asmáticos, demonstrado pelo significativamente menor número total de células no LBA no grupo AOP em relação ao grupo A.

Tabela 1. Número absoluto e relativo de células no LBA de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe.

	GRUPOS			
	C	OP	A	AOP
Total de células ( $\times 10^6/\text{mL} \pm \text{EPM}$ )	1,29 $\pm$ 0,12 n=30	1,74 $\pm$ 0,19 n=18	3,33 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup> n=22	2,04 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup> n=17
Eosinófilos ( $\times 10^5/\text{mL} \pm \text{EPM}$ )	0,07 $\pm$ 0,02 n=11	0,11 $\pm$ 0,06 n=8	3,37 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup> n=9	6,40 $\pm$ 0,83 <sup>a b</sup> n=7
Macrófagos ( $\times 10^5/\text{mL} \pm \text{EPM}$ )	8,68 $\pm$ 1,75 n=11	10,44 $\pm$ 1,65 n=8	10,76 $\pm$ 1,78 n=9	7,05 $\pm$ 1,20 n=7
Linfócitos ( $\times 10^5/\text{mL} \pm \text{EPM}$ )	0,57 $\pm$ 0,14 n=11	0,50 $\pm$ 0,10 n=8	3,78 $\pm$ 1,98 n=9	0,57 $\pm$ 0,22 n=7
Neutrófilos ( $\times 10^5/\text{mL} \pm \text{EPM}$ )	0,35 $\pm$ 0,18 n=11	0,67 $\pm$ 0,41 n=8	2,95 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup> n=9	0,72 $\pm$ 0,27 n=7

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM dos grupos Controle (C), Suplementado com óleo de peixe (OP), Asmático (A) e Asmático suplementado com óleo de peixe (AOP). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C; <sup>b</sup> p<0,05 vs. A.

As células presentes no lavado broncoalveolar (LBA) incluíam macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. A indução de asma resultou em um número significativamente maior de eosinófilos no LBA (grupo A vs. C), uma característica da inflamação asmática, e esse número foi ainda maior após a suplementação com

óleo de peixe, demonstrado pelo aumento significativo do número de eosinófilos no grupo AOP em relação ao grupo A. O número de neutrófilos foi significativamente maior no grupo A em relação ao grupo controle. A suplementação com óleo de peixe não alterou a infiltração de neutrófilos para os pulmões dos animais asmáticos, pois embora o número de neutrófilos pareça menor, a diferença não é significativa no grupo AOP em relação ao grupo A. O número de macrófagos e linfócitos não foi significativamente diferente entre os grupos, embora, novamente, o número dessas populações de células sejam numericamente menores no grupo AOP do que no grupo A.

As Figuras 10, 11, 12 e 13, apresentadas nas próximas 2 páginas, são fotomicrografias de um dos campos contados de uma lâmina representativa de um animal do grupo C, um animal do grupo OP, um animal do grupo A e um animal do grupo AOP, respectivamente. Nos grupos C e OP as células que aparecem são mononucleares. Já nos grupos A e AOP, pode-se observar a presença de eosinófilos (polimorfonucleares), cujos citoplasmas coraram-se de laranja, e o núcleo das células é segmentado.

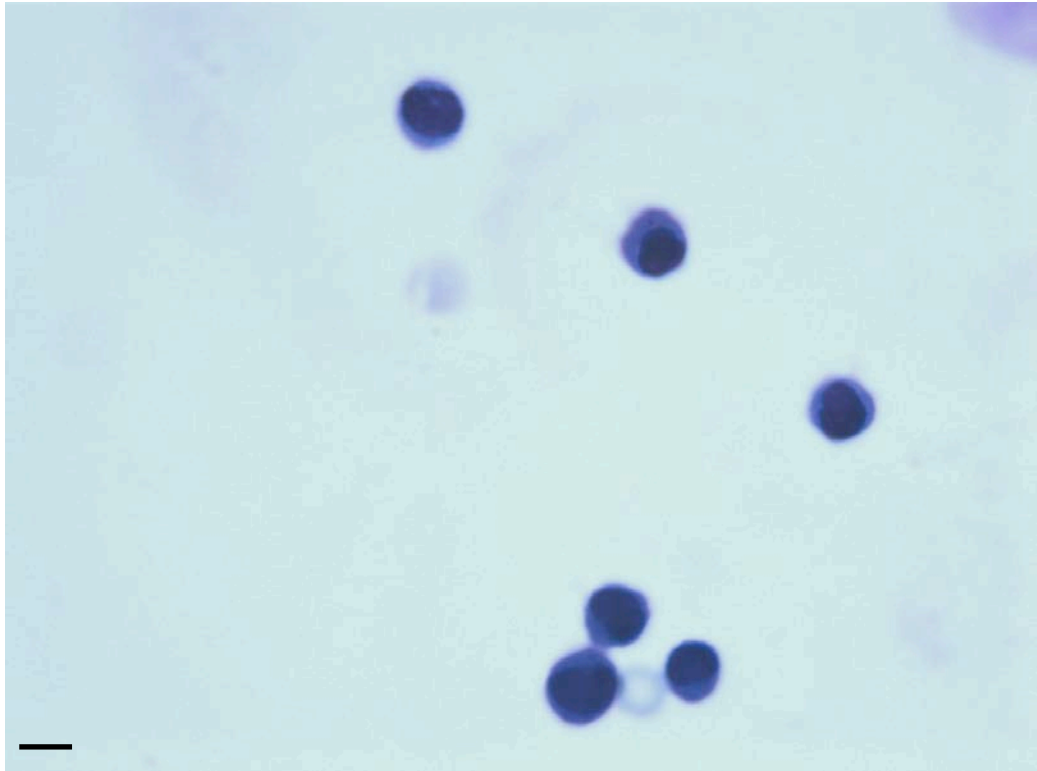


Figura 10– Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo C, indicando a presença de células mononucleares. O traço preto embaixo e à esquerda na figura é a escala de 10  $\mu\text{m}$ .

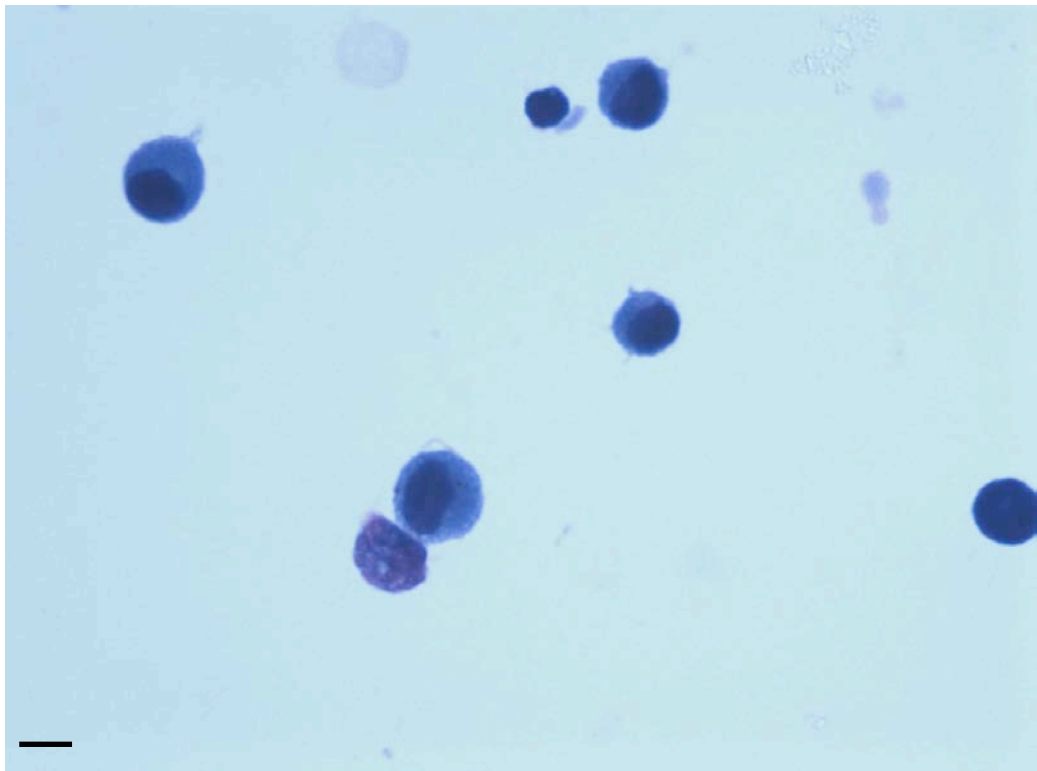


Figura 11– Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo OP, indicando a presença de células mononucleares. O traço preto embaixo e à esquerda na figura é a escala de 10  $\mu\text{m}$ .

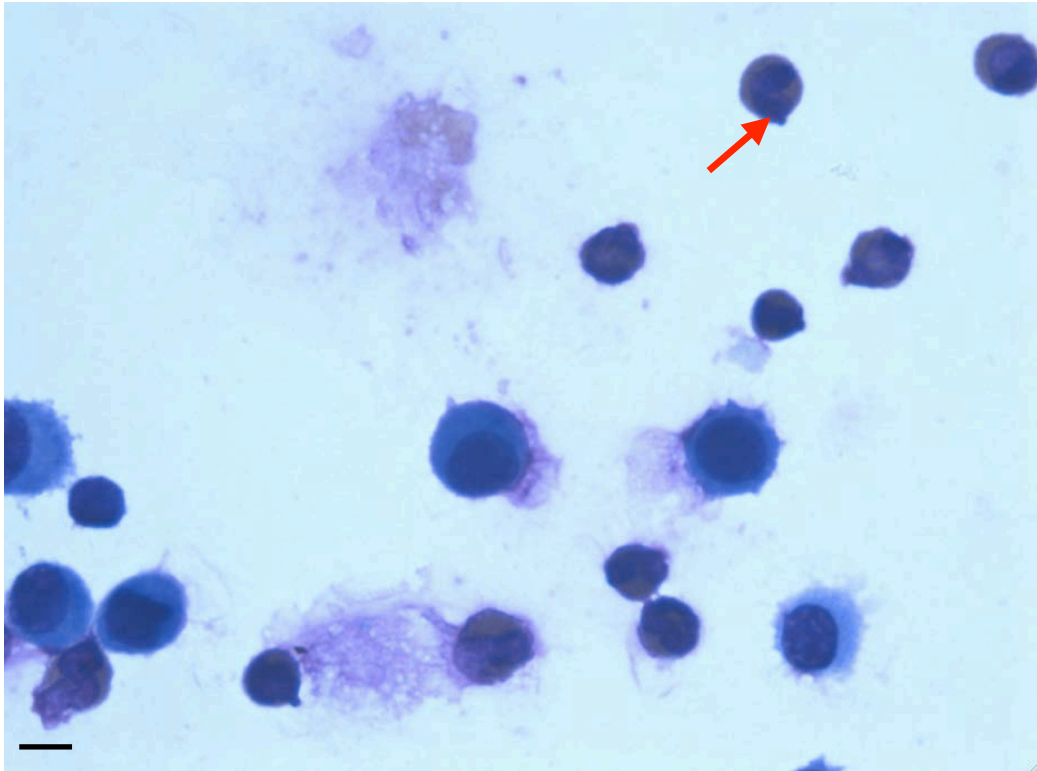


Figura 12– Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo A, indicando a presença de células mononucleares e e polimorfonucleares (eosinófilos). A flecha vermelha indica um eosinófilo, com citoplasma corado em laranja e núcleo segmentado. O traço preto embaixo e à esquerda na figura é a escala de 10  $\mu\text{m}$ .

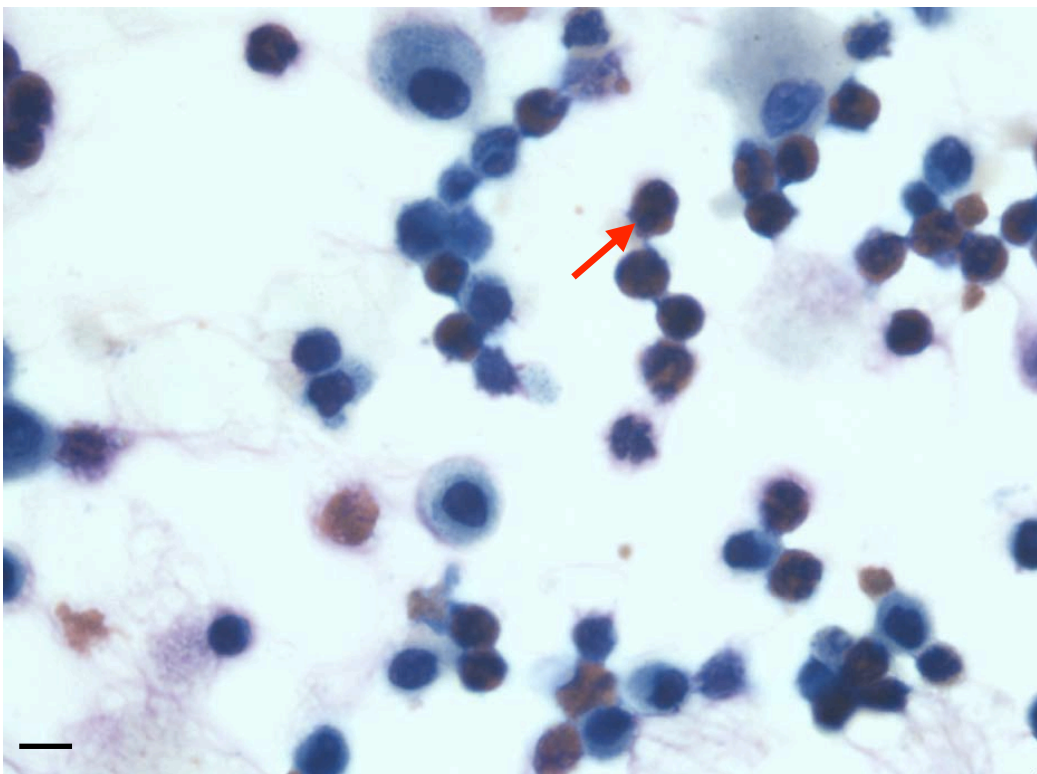


Figura 13– Fotomicrografia de um campo de uma lâmina representativa do grupo AOP, indicando a presença de células mononucleares e polimorfonucleares (eosinófilos). A flecha vermelha indica um eosinófilo, com citoplasma corado em laranja e núcleo segmentado. O traço preto embaixo e à esquerda na figura é a escala de 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 CAPACIDADE DE ADESÃO E CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Os macrófagos alveolares isolados do LBA do grupo asmático (A) apresentaram maior capacidade de adesão em relação aos do grupo controle (C) (Figura 14), apresentadas pela absorbância de  $0,169 \pm 0,012$  e de  $0,125 \pm 0,006$ , respectivamente. No grupo asmático suplementado com óleo de peixe a capacidade de adesão dos macrófagos alveolares, apresentada pela absorbância de  $0,158 \pm 0,016$ , não foi modificada, assim como no grupo não asmático suplementado, cuja absorbância foi de  $0,131 \pm 0,009$ . A capacidade fagocitária também foi maior para os macrófagos alveolares do grupo A em relação ao grupo C (Figura 15), nos quais a absorbância foi de  $0,177 \pm 0,014$  e de  $0,134 \pm 0,006$ , respectivamente. A suplementação com óleo de peixe nos animais asmáticos diminuiu a capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares, que foi de  $0,135 \pm 0,007$ , que voltou a ficar semelhante à dos animais controle. No grupo de animais não asmáticos suplementados a absorbância foi de  $0,154 \pm 0,013$ , que também não foi diferente em relação ao grupo controle.

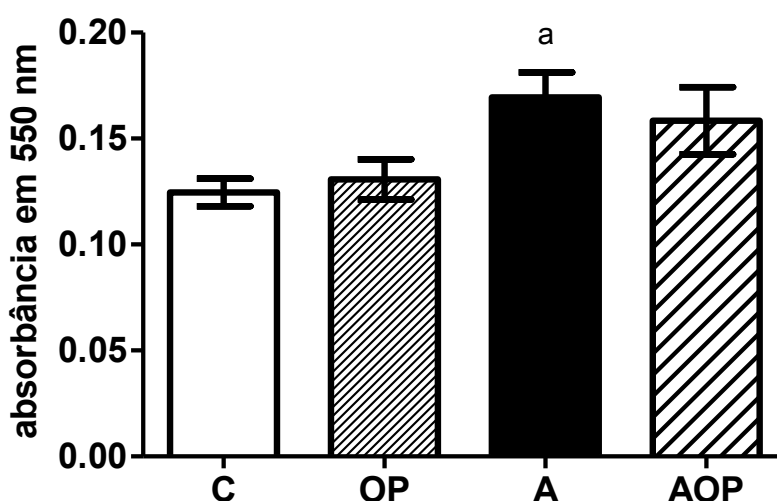


Figura 14. Capacidade de adesão de macrófagos de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C(n=57), OP (n=36), A (n=41) e AOP (n=33).<sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C.

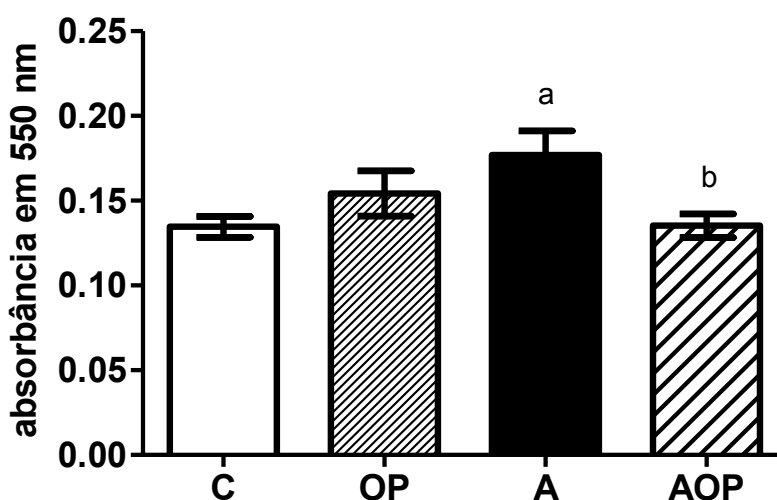


Figura 15. Capacidade fagocitária de macrófagos de ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C(n=34), OP (n=27), A (n=34) e AOP (n=29).<sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. A.

#### 4.3 RESPONSIVIDADE DO MÚSCULO LISO DAS VIAS AÉREAS

A resposta funcional do músculo liso isolado dos anéis de traqueia à acetilcolina está apresentada na Figura 16 (A). A força de contração foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) no músculo liso dos animais asmáticos ( $2,813 \pm 0,364$  mN) comparada com os do grupo controle não asmático ( $5,144 \pm 0,273$  mN). A força de contração no grupo AOP também foi significativamente menor quando comparada com o grupo controle, mas não foi diferente da força no grupo A, sugerindo que a suplementação com óleo de peixe tem menor ação sobre a função do músculo liso das vias aéreas em animais asmáticos. Entretanto, a resposta do músculo liso das vias aéreas à acetilcolina no grupo não asmático suplementado com óleo de peixe (OP) foi significativamente menor ( $3,120 \pm 0,215$  mN,  $p < 0,05$ ) do que no grupo controle, o que demonstra que o óleo de peixe tem efeito direto na função do músculo liso das vias aéreas na ausência da asma.

A Figura 16 (B) mostra a resposta funcional do músculo liso das vias aéreas ao isoproterenol, um agonista do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. O relaxamento do músculo liso foi significativamente maior nos ratos asmáticos do que nos do grupo controle ( $0,522 \pm 0,051$  mN,  $p < 0,05$ ). A suplementação com óleo de peixe nos

animais asmáticos diminuiu significativamente o relaxamento do músculo em relação ao grupo asmático.

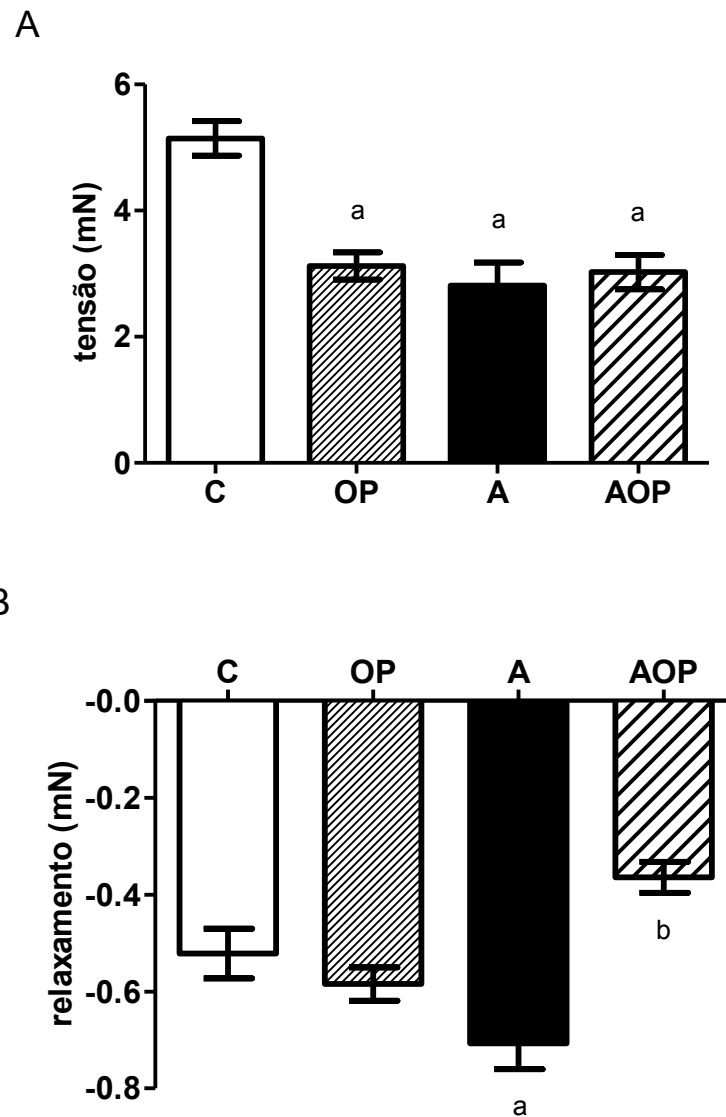


Figura 16. Força de contração (A) e relaxamento (B) do músculo liso das vias respiratórias medidos em resposta a 150  $\mu$ M de Ach e a 100  $\mu$ M de Iso, respectivamente. (A) Os dados são média  $\pm$  EPM de C (n = 8), OP (n = 6), A (n = 8) e AOP (n = 8). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C. (B) Os dados são média  $\pm$  EPM de C (n = 12), OP (n = 8), A (n = 8) e AOP (n = 4). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C; <sup>b</sup> p<0,05 vs. A.

#### 4.4 COMPLACÊNCIA PULMONAR ESTÁTICA



A figura 17 mostra os resultados da complacência estática pulmonar nos grupos experimentais. A complacência pulmonar estática nos animais asmáticos foi significativamente menor do que nos animais do grupo controle. A suplementação com óleo de peixe nos animais asmáticos resultou em aumento da complacência pulmonar estática em relação ao grupo A, ficando igual ao grupo controle não asmático.

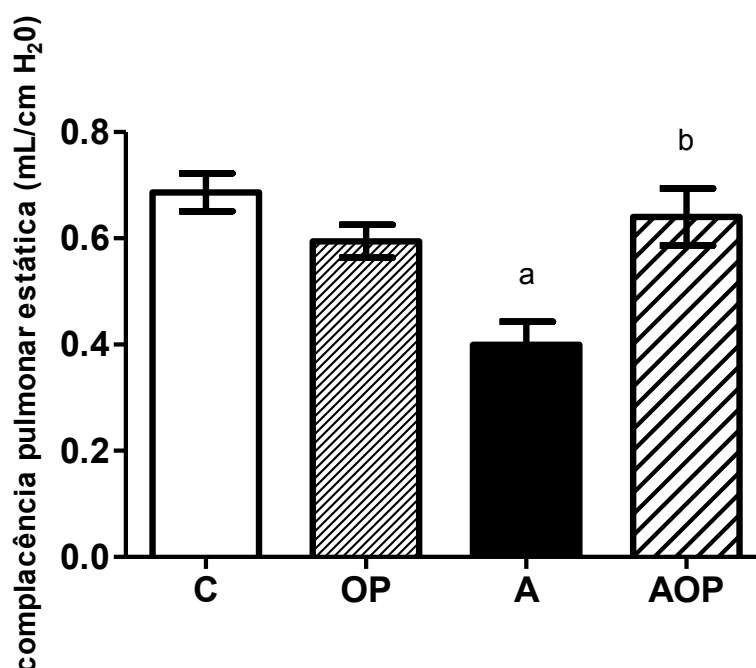


Figura 17. Complacência pulmonar estática em ratos asmáticos e não asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n = 12), OP (n = 11), A (n = 9) e AOP (n = 8). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e OP; <sup>b</sup> p<0,05 vs. A.

#### 4.5 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS BRONQUÍOLOS E MUCO

A Tabela 2 resume os dados da análise morfométrica. Não houve diferenças estatisticamente significativas no número e no tamanho dos bronquíolos entre os grupos experimentais, indicando que a seleção dos bronquíolos para análise foi igual para todos os grupos.

As dimensões normalizadas da parede das vias aéreas não foram diferentes entre os grupos, indicando que a espessura da camada de músculo liso ou da

camada adventícia não foi alterada pela asma ou pelo óleo de peixe. A área que estava obliterada com muco foi determinada como porcentagem da área interna dos bronquíolos. A média de área obliterada foi significativamente maior nos grupos A e AOP quando comparada com o grupo C. A suplementação com óleo de peixe não alterou a área obliterada com muco, uma vez que as médias não foram diferentes entre os grupos OP e C e entre os grupos AOP e A. A porcentagem média de bronquíolos que apresentaram muco foi de 50% para o grupo C, 46,2% para o grupo OP, 54,5% para o grupo A e 70% para o grupo AOP.

Tabela 2. Análise morfométrica histológica do tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe.

	GRUPOS			
	C	OP	A	AOP
Número total de bronquíolos	14	13	11	10
Número de bronquíolos obtidos de cada animal	2,8 ± 0,4	3,3 ± 0,6	2,8 ± 0,5	3,3 ± 0,9
Pi (µm ± EPM)	551,1±111,2	411,0±56,8	391,6±45,1	500,0±74,8
W <sub>Ai</sub> (µm <sup>2</sup> ± EPM)	20.621 ±4.657	18.685 ±2.831	15.973 ±2.502	25.680 ±6.068
W <sub>Ao</sub> (µm <sup>2</sup> ± EPM)	12.314 ±3.186	9.446 ±1.542	13.473 ±2.701	17.340 ±4.411
W <sub>AT</sub> (µm <sup>2</sup> ± EPM)	32.936 ±7.783	28.138 ±4.266	29.445 ±4.785	43.020 ±10.345
W <sub>AT</sub> /A <sub>i</sub> * (µm <sup>2</sup> /µm ± EPM)	0,21±0,05	0,30±0,06	0,26±0,04	0,22±0,03
W <sub>Ai</sub> /A <sub>i</sub> * (µm <sup>2</sup> /µm ± EPM)	0,13±0,03	0,20±0,04	0,14±0,02	0,13±0,01
Número de bronquíolos com muco	7	6	6	7
Muco (% de A <sub>i</sub> obliterada ± EPM)	8,95±1,87	16,15±6,00	36,67±8,51 <sup>a</sup>	33,25±4,29 <sup>a</sup>

Os dados são apresentados como média ± EPM dos grupos dos grupos Controle (C) (n = 5), Suplementado com óleo de peixe (OP) (n = 4), Asmático (A) (n = 4) e Asmático suplementado com óleo de peixe (AOP) (n = 3). W<sub>Ai</sub> = área da parede interna; W<sub>Ao</sub> = área da parede adventícia; W<sub>AT</sub> = área total da parede. O espessamento da parede das vias aéreas foi calculado como W<sub>AT</sub>/A<sub>i</sub>\*, onde A<sub>i</sub>\* é a área luminal ideal da via relaxada, calculada como A<sub>i</sub>\* = Pi/4pi, usada para normalizar a área da parede das vias aéreas e minimizar diferenças relacionadas ao tamanho dos bronquíolos. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C.

As Figuras 18, 19, 20 e 21 são fotomicrografias representativas de um dos bronquíolos analisados dos grupos C, OP, A e AOP respectivamente. No bronquíolo representativo dos grupos A e AOP (Figuras 20 e 21), pode-se observar a presença de muitas células inflamatórias no tecido periférico adjacente, bem como a presença de muco na luz do bronquíolo, o que não está presente no bronquíolo dos grupos C e OP (Figuras 18 e 19).

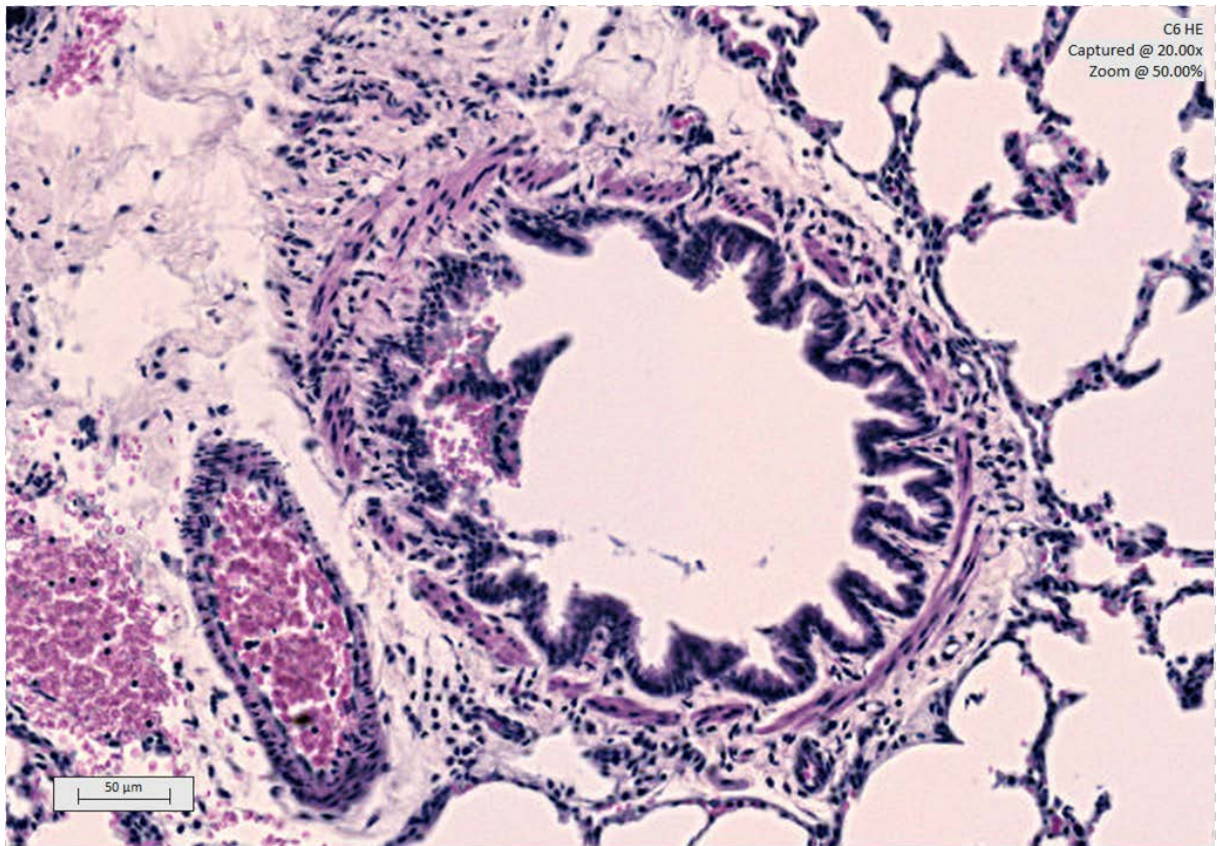


Figura 18 – Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados do grupo C.

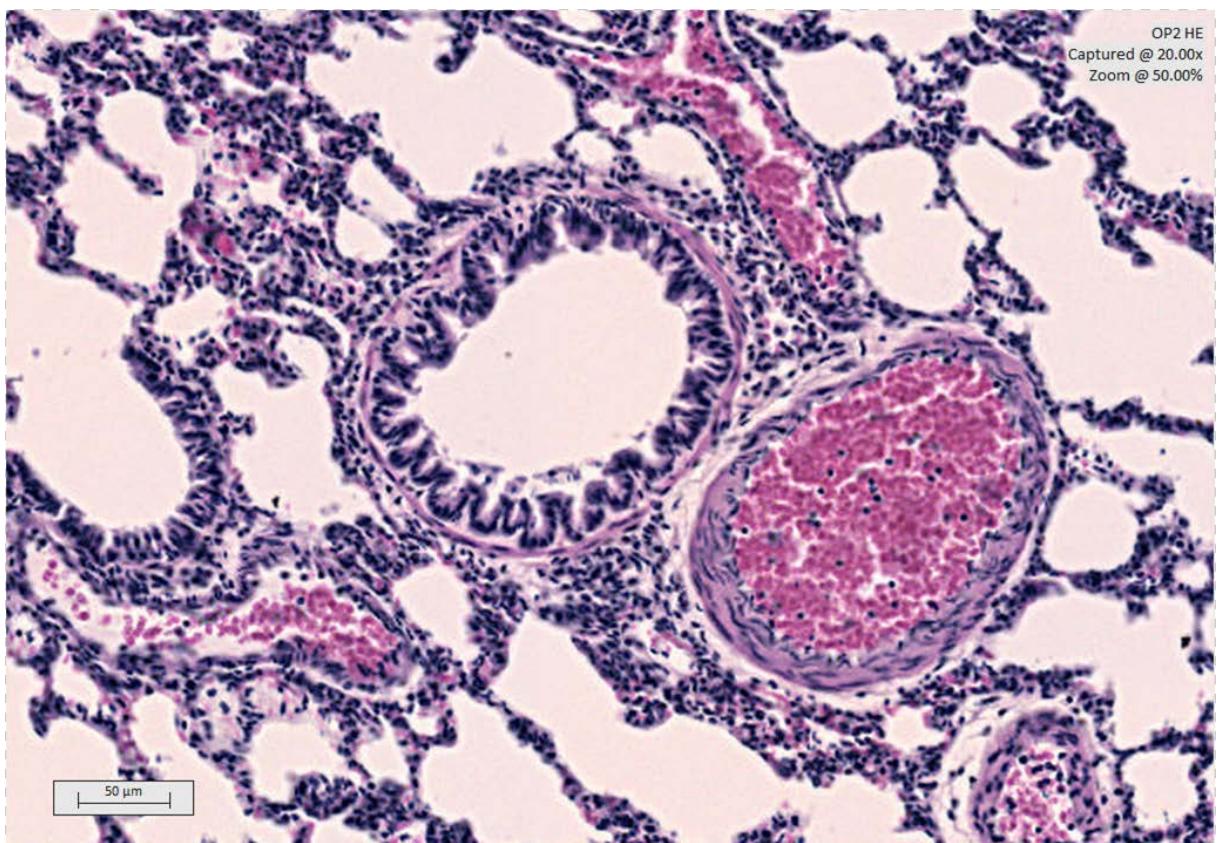


Figura 19 – Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados do grupo OP.



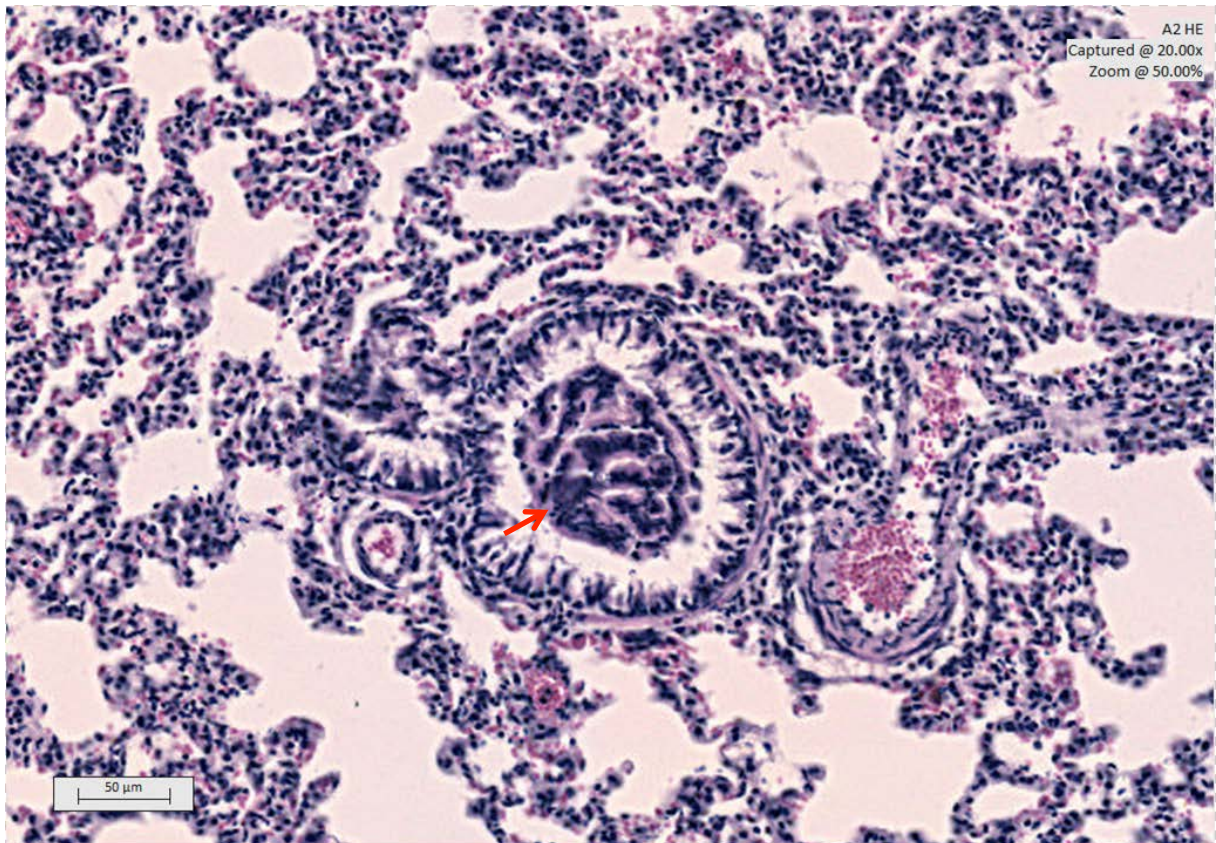


Figura 20 – Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados do grupo A. A flecha vermelha indica a presença de área obliterada na luz do bronquíolo.

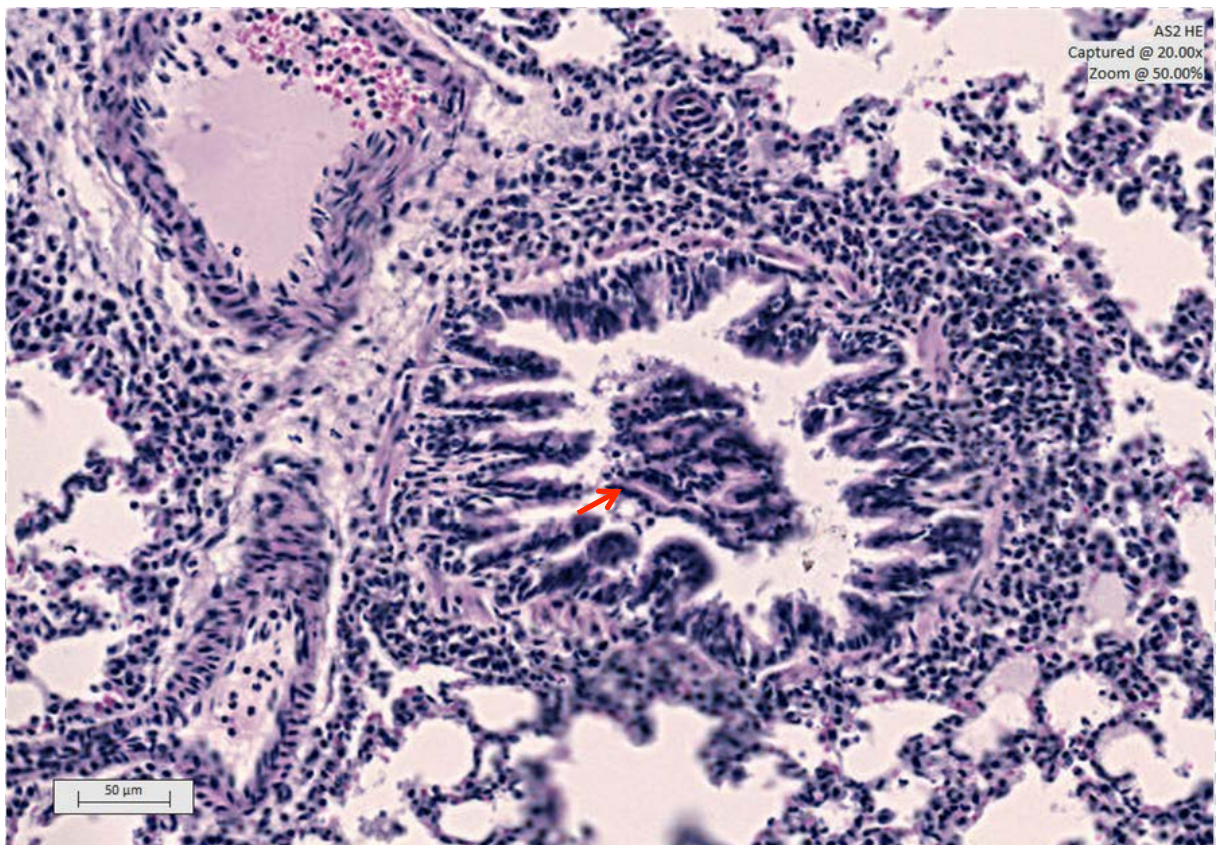


Figura 21 – Fotomicrografia representativa de um dos bronquíolos analisados do grupo AOP. A flecha vermelha indica a presença de área obliterada na luz do bronquíolo.

#### 4.6 CONCENTRAÇÕES DE TNF- $\alpha$ E IL-1 $\beta$ NO TECIDO PULMONAR

A concentração de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior nos pulmões dos animais asmáticos do que nos animais controle, o que era esperado (Figura 22) para o modelo de asma, de acordo com o que foi descrito na revisão de literatura. A concentração de TNF- $\alpha$  não foi alterada pela suplementação com óleo de peixe, nem nos animais asmáticos nem nos não asmáticos. Assim, o óleo de peixe suplementado não teve efeito sobre a concentração dessa citocina pró-inflamatória.

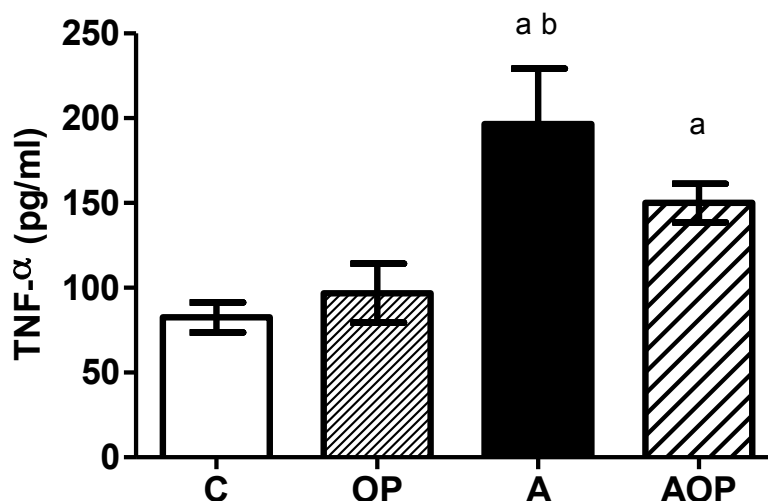


Figura 22. Concentração de TNF- $\alpha$  em tecido pulmonar de ratos não asmáticos e asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n = 30), OP (n = 15), A (n = 9) e AOP (n = 17). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C; <sup>b</sup> p<0,05 vs. OP.

A concentração de IL-1 $\beta$  foi maior nos pulmões dos animais asmáticos do que nos animais controle, o que também era esperado. Conforme revisado anteriormente, a indução de asma promove o aumento dessa citocina inflamatória. A concentração de IL-1 $\beta$  não foi alterada pela suplementação com óleo de peixe, nem nos animais asmáticos nem nos não asmáticos (Figura 23). Da mesma forma, o óleo de peixe suplementado não teve efeito sobre a concentração dessa citocina pró-inflamatória.

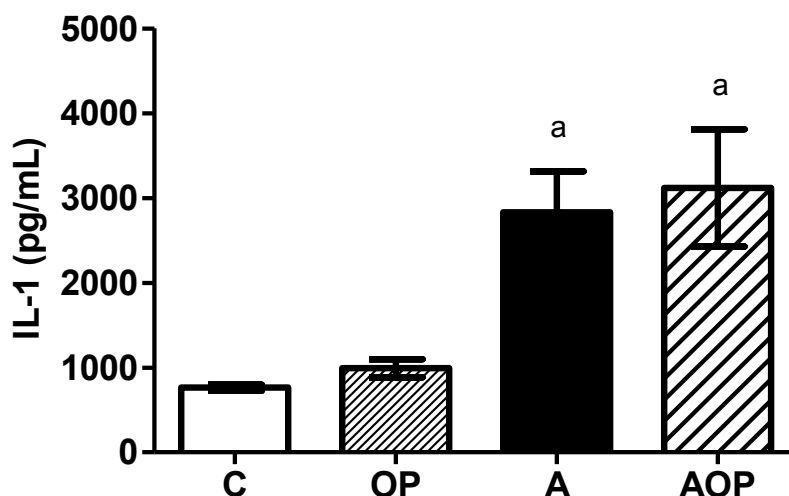


Figura 23. Concentração de IL-1 $\beta$  em homogenato de tecido pulmonar de ratos não asmáticos e asmáticos suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n = 8), OP (n = 9), A (n = 11) e AOP (n = 12). <sup>a</sup> p<0,05 vs. C.

#### 4.7 CONCENTRAÇÃO DE EICOSANÓIDES NOS PULMÕES

Os resultados das concentrações de PGE<sub>2</sub> são apresentados na Figura 24. A concentração de PGE<sub>2</sub> no grupo AOP (182,0  $\pm$  7,1 pg/mg de pulmão) foi significativamente mais baixa do que no A (265,8  $\pm$  13,6 pg/mg de pulmão) e não foi significativamente diferente do C (189,9  $\pm$  23,8 pg/mg de pulmão). A concentração de PGE<sub>2</sub> foi significativamente maior em comparação com o grupo C, o que era esperado para o modelo de asma utilizado. A concentração de PGE<sub>2</sub> no grupo OP (155,7  $\pm$  11,8 pg/mg pulmão) não foi diferente do C. Assim, a suplementação com óleo de peixe na dieta de ratos asmáticos diminuiu a produção de PGE<sub>2</sub>.

A Figura 25 mostra as concentrações de TXB<sub>2</sub>. O TXB<sub>2</sub> é um metabólito estável do TXA<sub>2</sub> e foi utilizado para avaliar indiretamente as concentrações deste último, o qual é o prostanoide pró-inflamatório ativo, mas muito instável. Houve uma diminuição significativa na concentração de TXB<sub>2</sub> no grupo AOP (1031  $\pm$  81,2 pg/mg pulmão) em comparação com o A (1619  $\pm$  114,1 pg/mg pulmão), o que demonstra um efeito anti-inflamatório do óleo de peixe. A concentração de TXB<sub>2</sub> foi significativamente maior no grupo A do que no C (1207  $\pm$  89,0 pg/mg pulmão),



demonstrando o aumento da produção de  $\text{TXB}_2$  no modelo asmático, em decorrência do aumento de  $\text{TXA}_2$ . A concentração  $\text{TXB}_2$  em OP ( $642,7 \pm 85,9$  pg/mg pulmão) foi menor do que em C. Assim, o óleo de peixe suplementado na dieta diminuiu a produção de  $\text{TXB}_2$  tanto na condição asmática como na não asmática.

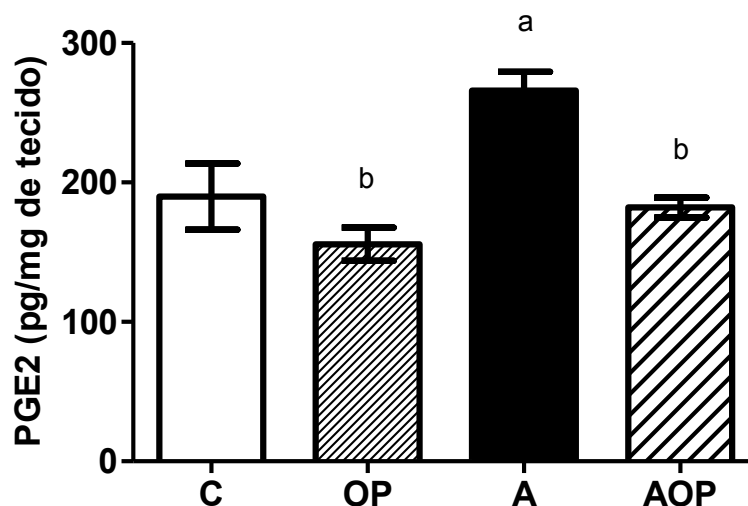


Figura 24. Concentração de prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n=11), OP (n=13), A (n=12), AOP (n=15). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. A.

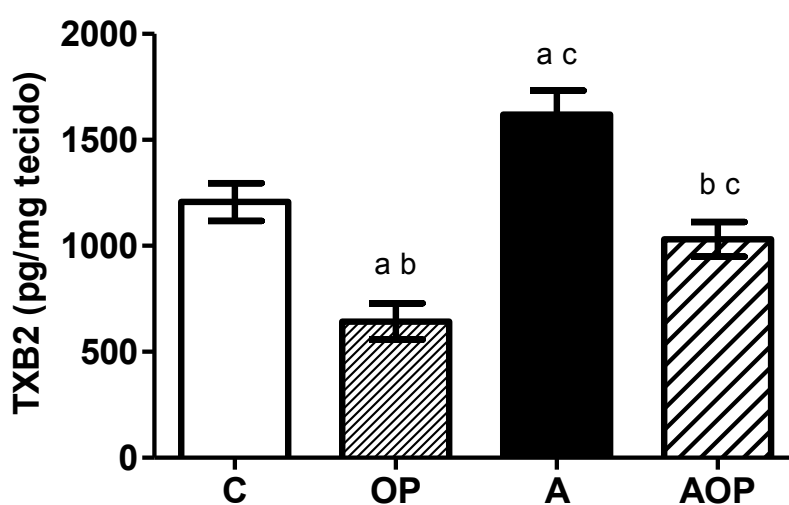


Figura 25. Concentração de tromboxano  $\text{B}_2$  ( $\text{TXB}_2$ ) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n=15), OP (n=15), A (n=15), AOP (n=15). <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. A; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. OP.

A concentração de LTB<sub>4</sub> não foi diferente entre AOP ( $62,6 \pm 5,3$  pg/mg pulmão) e A ( $73,6 \pm 7,5$  pg/mg pulmão) (Figura 26). Esse resultado é relevante, pois os leucotrienos, produzidos a partir do AA pela via da 5-lipo-oxigenase, são os principais mediadores da hiper-responsividade na asma. A asma aumentou a produção de LTB<sub>4</sub>, conforme demonstrado pela concentração significativamente mais elevada em A do que em C ( $39,8 \pm 5,4$  pg/mg pulmão). A concentração de LTB<sub>4</sub> não foi estatisticamente diferente entre OP ( $47,5 \pm 5,9$  pg/mg pulmão) e C. Estes resultados demonstram que a suplementação com óleo de peixe não teve nenhum efeito sobre a produção de LTB<sub>4</sub> em ambas as condições asmática e não asmática, resultado que pode contribuir para a falta de efeito do óleo de peixe sobre a hiper-responsividade na asma.

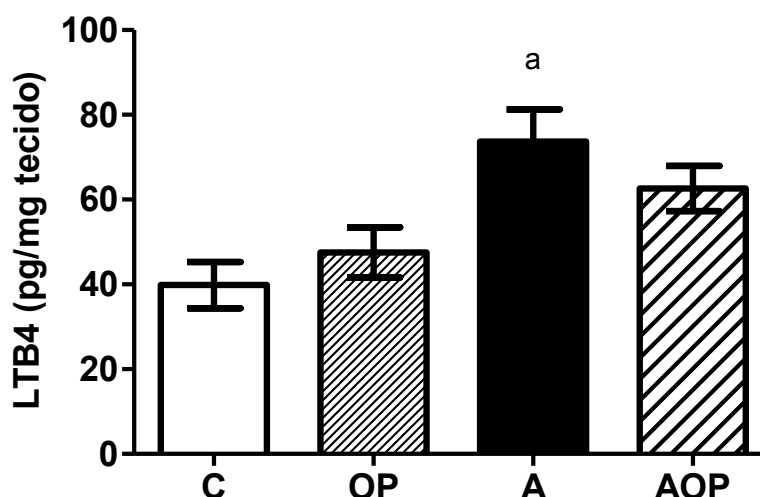


Figura 26. Concentração de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n=15), OP (n=13), A (n=15), AOP (n=15). <sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. C.

A Figura 27 mostra as concentrações de 8-Iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , um prostanoide formado a partir da oxidação não-enzimática do AA. A concentração de 8-Iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  no grupo AOP ( $33,9 \pm 1,3$  pg/mg pulmão) foi significativamente menor do que em A ( $56,7 \pm 2,1$  pg/mg pulmão) e do que em C ( $45,3 \pm 3,8$  pg/mg pulmão). Em A, a concentração foi mais elevada do que em C, o que era esperado, uma vez que na asma há maior estresse oxidativo e geração de moléculas por peroxidação lipídica.



Houve uma redução significativa na concentração de 8-Iso PGF<sub>2α</sub> no grupo OP (31,4 ± 2,6 pg/mg pulmão) em relação ao C. Assim, a suplementação com óleo de peixe reduziu a produção dos isoprostanos, o que também pode ser um efeito anti-inflamatório.

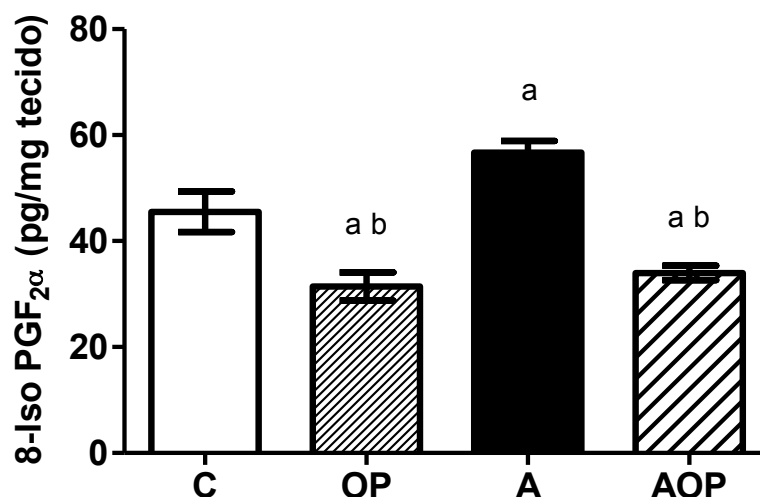


Figura 27. Concentração de 8-isoprostano PGF<sub>2α</sub> (8-IsoPGF<sub>2α</sub>) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média ± EPM de C (n=12), OP (n=13), A (n=12), AOP (n=14). <sup>a</sup> p<0.05 vs. C; <sup>b</sup> p<0.05 vs. A.

A concentração de LXA<sub>4</sub> foi significativamente menor no grupo AOP (0,031 ± 0,002 ng/mg pulmão) do que em A (0,122 ± 0,015 ng/mg pulmão) e não foi significativamente diferente de C (0,032 ± 0,001 ng/mg pulmão) (Figura 28). A LXA<sub>4</sub>, gerada a partir do AA, participa da resolução da inflamação asmática. A concentração de LXA<sub>4</sub> foi significativamente maior no grupo A do que no C e não foi diferente entre OP (0,026 ± 0,003 ng/mg pulmão) e C. Deste modo, a suplementação com óleo de peixe reduziu a produção de LXA<sub>4</sub> na condição asmática, o que pode prejudicar a resolução da inflamação nos animais asmáticos.

A concentração de RvE<sub>1</sub> ficou próxima do limite inferior de detecção do kit, em todos os grupos (Figura 29). A RvE<sub>1</sub> pode ser formada enzimaticamente a partir do EPA presente no óleo de peixe, e é considerada anti-inflamatória. Apesar da suplementação com óleo de peixe, não houve alteração detectável das concentrações de RvE<sub>1</sub> no tecido pulmonar dos animais nesse estudo.

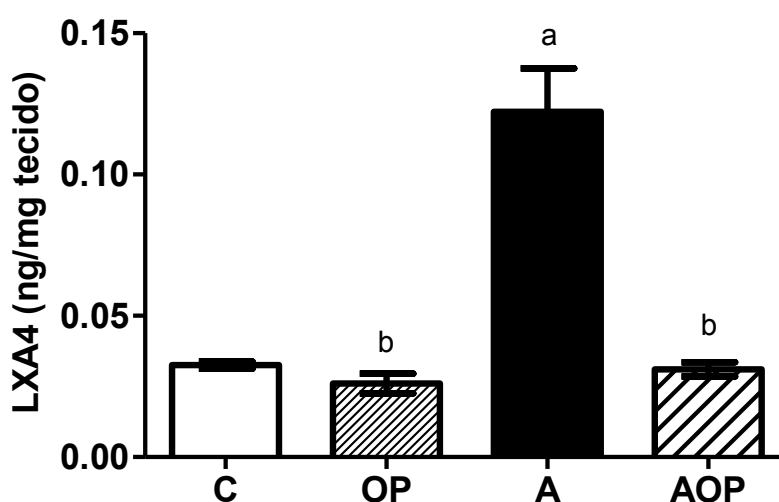


Figura 28. Concentração de lipoxina  $A_4$  (LXA $_4$ ) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n = 12); OP (n = 13), A (n = 10); AOP (n = 15). <sup>a</sup> p<0,05 vs.C; <sup>b</sup> p<0,05 vs. A.

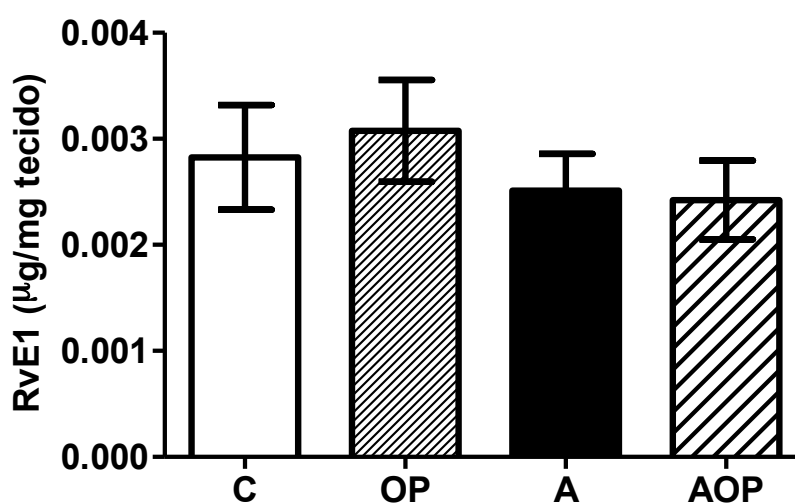


Figura 29. Concentração de Resolvin  $E_1$  (RvE $_1$ ) no tecido pulmonar de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM de C (n=12), OP (n=13), A (n=12), AOP (n=14).

#### 4.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO PULMONAR

Os resultados da análise dos ácidos graxos estão apresentados na Tabela 3. O óleo de peixe suplementado na dieta aumentou significativamente a razão de

ácido graxo n-3/n-6 no pulmão, tanto nos ratos asmáticos (2,8 vezes mais elevada em AOP do que em A) como de ratos não asmáticos (2,9 vezes maior em OP do que em C).

Tabela 3. Porcentagem de ácidos graxos dos lipídios totais do pulmão de ratos asmáticos e não asmáticos, suplementados ou não com óleo de peixe obtidas por cromatografia gasosa.

	C n=16	OP n=16	A n=16	AOP n=16
Ácidos graxos				
C14:0	1,52±0,06	1,63±0,06	1,56±0,04	1,66±0,07
C15:0	0,58±0,02	0,60±0,02	0,63±0,02	0,60±0,03
C16:0	34,61±0,58	33,77±0,38 <sup>a</sup>	36,97±0,47 <sup>c</sup>	36,13±0,80 <sup>c</sup>
C17:0	0,90±0,10	1,18±0,17	0,79±0,07	0,70±0,07 <sup>c</sup>
C18:0	12,57±0,33	12,98±0,24	12,78±0,18	12,29±0,30
C20:0	0,26±0,01	0,28±0,01	0,24±0,01	0,25±0,02
C22:0	0,32±0,01	0,40±0,02 <sup>a</sup>	0,31±0,02 <sup>c</sup>	0,35±0,02
C24:0	0,37±0,03	0,34±0,03	0,38±0,02	0,30±0,01
C18:3 n-3	0,21±0,01	0,26±0,02	0,21±0,01	0,20±0,01 <sup>c</sup>
C20:4 n-3	0,21±0,01	0,27±0,02	0,21±0,01	0,21±0,02
C20:5 n-3	0,33±0,09	0,89±0,07 <sup>ab</sup>	0,17±0,01	0,89±0,05 <sup>ab</sup>
C22:5 n-3	1,11±0,08	3,05±0,03 <sup>ab</sup>	1,15±0,05	3,00±0,16 <sup>ab</sup>
C22:6 n-3	1,19±0,04	2,52±0,13 <sup>ab</sup>	1,32±0,06	2,72±0,13 <sup>ab</sup>
C18:2 n-6	10,91±0,19	10,98±0,24	10,44±0,13	10,58±0,14
C18:3 n-6	0,27±0,01	0,22±0,01	0,30±0,01 <sup>c</sup>	0,27±0,02
C20:3 n-6	0,75±0,03	0,88±0,03 <sup>ab</sup>	0,77±0,02	0,87±0,02 <sup>ab</sup>
C20:4 n-6	15,42±0,47	13,04±0,18 <sup>ab</sup>	16,54±0,23	14,22±0,26 <sup>ab</sup>
C16:1 n-7	1,79±0,08	1,79±0,03 <sup>b</sup>	2,00±0,05	1,76±0,05 <sup>b</sup>
C18:1 n-9	11,48±0,49	11,09±0,10	10,00±0,11 <sup>a</sup>	9,69±0,28 <sup>ac</sup>
C18:1 n-7	1,97±0,03	1,94±0,03	1,93±0,03	2,00±0,04
C20:1 n-9	0,33±0,01	0,36±0,01	0,34±0,02	0,30±0,02 <sup>c</sup>
C20:2 n-6	0,74±0,02	0,73±0,02	0,81±0,01	0,71±0,03 <sup>b</sup>
C24:1 n-9	0,18±0,01	0,24±0,01	0,21±0,01	0,23±0,02
AG sat/insat	0,696±0,012	0,722±0,011	0,654±0,010 <sup>c</sup>	0,696±0,014
AG n-3/n-6	0,099±0,003	0,289±0,008 <sup>ab</sup>	0,106±0,002	0,276±0,008 <sup>ab</sup>
AA/EPA	82,69±1,270	17,76±2,709 <sup>ab</sup>	98,89±6,519	17,76±2,320 <sup>ab</sup>

Os dados são apresentados como média ± EPM dos grupos Controle (C), Suplementado com óleo de peixe (OP), Asmático (A) e Asmático suplementado com óleo de peixe (AOP). Os ácidos graxos estão apresentados pelo código numérico, com o número de carbonos e de insaturações na molécula, seguido, quando da presença de insaturações, da nomenclatura n, que indica a numeração do carbono em que está a primeira insaturação da molécula contado a partir do terminal metila. C14:0 (ácido tetradecanoico ou mirístico); C15:0 (ácido pentadecanoico); C16:0 (ácido hexadecanoico ou palmítico); C17:0 (ácido heptadecanoico ou margárico); C18:0 (ácido octodecanoico ou esteárico); C20:0 (ácido eicosanoico ou araquídico); C22:0 (ácido beênico); C24:0 (ácido lignocérico); C18:3 n-3 (ácido alfa-linolênico); C20:4 n-3 (ácido eicosatetraenoico); C20:5 n-3 (ácido eicosapentenoico); C22:5 n-3 (ácido docosapentaenoico); C22:6 n-3 (ácido docosahexaenoico); C18:2 n-6 (ácido linoleico); C18:3 n-6 (ácido gama-linolênico); C20:3 n-6 (ácido dihomogama-linolênico); C20:4 n-6 (ácido eicosatetraenoico ou araquidônico); C16:1 n-7 (ácido palmitoleico); C18:1 n-9 (ácido oleico); C18:1 n-7 (ácido vacênico); C20:1 n-9 (ácido eicosenoico); C20:2 n-6 (ácido eicosadienoico) e C24:1 n-9 (ácido tetracosenoico).<sup>a</sup> p<0,05 vs. C; <sup>b</sup> p<0,05 vs. A; <sup>c</sup> p<0,05 vs. OP.

A porcentagem significativamente inferior de AA (n-6) em OP e AOP, que foi o ácido graxo insaturado com a maior proporção no tecido pulmonar de todos os

grupos, e a porcentagem significativamente mais elevada de EPA (2,7 vezes em OP em relação ao C e 5,2 vezes em AOP em relação ao A), DPA (2,7 e 2,6 vezes, respectivamente) e DHA (2,1 e 2 vezes, respectivamente) foram as principais alterações que resultaram no aumento da relação n-3/n-6 nos grupos suplementados com óleo de peixe, embora o ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico (C20:3 n-6) tenha apresentado porcentagem significativamente superior no grupo suplementado com óleo de peixe (cerca de 1,1 vez). A porcentagem do ácido graxo C20:2 n-6 foi reduzida no grupo AOP (cerca de 0,1%) em relação ao A, o que em conjunto com a redução do C20:4n-6 (AA), representou um decréscimo de 2,4% nos ácidos graxos n-6 no grupo AOP, contribuindo para a maior razão de n-3/n-6 no grupo AOP comparada com o grupo A, bem como o aumento de 4% de ácidos graxos n-3 (EPA, DPA e DHA).

A razão entre a porcentagem de AA e EPA também foi significativamente menor nos grupos suplementados com óleo de peixe, tanto asmáticos, como não asmáticos. A grande diferença é decorrente da redução de AA e aumento do EPA no tecido pulmonar dos animais suplementados. Esses resultados demonstram claramente que houve incorporação de EPA no tecido pulmonar em detrimento do AA.

A razão de AG saturados/insaturados não foi alterada pela suplementação com óleo de peixe nos ratos asmáticos e não asmáticos. Apesar das diferenças significativas encontradas na porcentagem dos AG C16:0 e C22:0 no grupo OP em relação ao C, e na porcentagem de AG C16:1 n-7 no grupo AOP e OP em relação ao A, estas não resultaram em alterações na razão de AG saturados/insaturados. A redução de cerca de 2% do AA nos grupos OP e AOP em comparação com C e A, respectivamente, e o aumento de EPA, DPA e DHA, que em conjunto resultou em cerca de 4%, também não foram suficientes para promover alterações na razão de AG saturados/insaturados. A razão entre AG saturados/insaturados no grupo A foi inferior em relação ao OP. Esta redução deveu-se à significativamente maior porcentagem do ácido graxo C16:0 em A em comparação com OP. Este ácido graxo foi o que apresentou a maior porcentagem em todos os grupos e, por conseguinte, as alterações na porcentagem deste AG são mais representativas na razão entre AG saturados/insaturados, apesar da significativamente menor porcentagem do AG C22:0 e da significativamente maior do AG C18:3 n-6 no grupo A do que no OP.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que a suplementação de ratos asmáticos com óleo de peixe foi capaz de reduzir o número de leucócitos no LBA, provavelmente como resultado da diminuição da quimiotaxia, demonstrando um papel anti-inflamatório deste suplemento. Embora não tenha sido específico para nenhum subtipo celular, esse efeito pode ser relevante, uma vez que a infiltração aumentada dos leucócitos encontrada, principalmente de neutrófilos e eosinófilos, e, já esperada para o modelo de asma induzida utilizado, está associada com as manifestações clínicas da doença. No entanto, a suplementação com óleo de peixe promoveu um aumento na infiltração de eosinófilos para o pulmão de ratos asmáticos. Este pode ser um efeito deletério uma vez que os eosinófilos desempenham papel importante na manutenção da inflamação (HALDAR *et al*, 2009) e na hiper-responsividade (JACOBSEN *et al*, 2012). A eosinofilia é um marcador de reações alérgicas e os eosinófilos estão envolvidos em episódios de exacerbação aguda (HALDAR *et al*, 2009), nas quais os sintomas são mais severos e menos controláveis com os medicamentos usuais. Os eosinófilos contêm proteínas catiônicas tais como proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e peroxidase de eosinófilos que afetam os receptores muscarínicos, o que resulta em aumento da capacidade de resposta do músculo liso das vias aéreas (MLA) (FRYER; JACOBY, 1998; VERBOUT *et al*, 2009). A proteína básica principal é também tóxica para as células epiteliais do trato respiratório, e há elevada correlação entre os níveis dessa proteína no LBA e a hiper-responsividade brônquica na asma (GLEICH, 2000). Assim, a ausência de efeito da suplementação com óleo de peixe nas respostas funcionais do MLA em ratos asmáticos pode, pelo menos em parte, estar relacionada com a infiltração de eosinófilos.

Várias citocinas foram descritas como fatores críticos envolvidos no recrutamento de populações particulares de células inflamatórias a partir da circulação para os pulmões através da interação com os seus receptores (TIAN *et al*, 2012). As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão envolvidas no recrutamento e ativação de neutrófilos e eosinófilos (TRIFILIEFF *et al*, 2002; DRAGON *et al*, 2007; CHAI *et al*, 2011). Essas citocinas são importantes mediadores da resposta associada com a infiltração eosinofílica (BROIDE *et al*, 2001), estimulando a produção de

quimiotaxinas como IL-8, RANTES e GM-CSF, as quais aumentam o recrutamento de eosinófilos (NAM *et al*, 2009). Contudo, a concentração destas citocinas no pulmão permaneceu elevada com a suplementação com óleo de peixe para os ratos asmáticos. Por conseguinte, a quimiotaxia reduzida e a resultante infiltração de leucócitos para os pulmões, não parece envolver uma alteração da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , cujas concentrações nos pulmões não foram diferentes entre os ratos asmáticos e asmáticos tratados com óleo de peixe. Embora o óleo de peixe tenha efeitos conhecidos sobre a redução dessas citocinas inflamatórias em algumas doenças (CALDER, 2006), nesse estudo esse efeito não foi encontrado. Uma vez que a migração de leucócitos não depende de uma única citocina (YANG *et al*, 1998), o efeito do óleo de peixe pode ocorrer através de várias ações simultâneas de diferentes componentes de adesão e migração. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3 no óleo de peixe podem reduzir a expressão de receptores para quimioatrativos (CALDER, 2010b), de modo a diminuir a capacidade de resposta dos leucócitos à presença de quimioatrativos, ou modificar a expressão de moléculas de adesão (CALDER, 2010b), ou alterar o perfil de mediadores lipídicos que estão envolvidos na circulação dos leucócitos (TULL *et al*, 2009). Por exemplo, foi recentemente demonstrado que a PGD<sub>2</sub> derivada do AA e a PGD<sub>3</sub> derivada do EPA tem efeitos opostos sobre o movimento de leucócitos através do endotélio, com a PGD<sub>2</sub> promovendo, e a PGD<sub>3</sub> inibindo esse processo (TULL *et al*, 2009). Assim uma mudança no perfil de mediadores lipídicos derivados de AGPI, que poderia ser promovida pelo aumento do suprimento de EPA e DHA no grupo asmático suplementado com óleo de peixe, poderia afetar de modo geral a infiltração de leucócitos.

O acúmulo de eosinófilos na asma pode ocorrer por uma combinação de aumento da migração e sobrevivência prolongada, que está sob a influência de fatores de crescimento produzidos localmente. A sobrevivência de eosinófilos é considerada um mecanismo importante para o acúmulo seletivo dessas células em doenças alérgicas (WARDLAW, 1999). Um dos fatores envolvidos no aumento da sobrevivência dos eosinófilos é o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (SANMUGALINGHAM *et al*, 2000). A migração dos eosinófilos na asma pode também ser regulada por quimiocinas secretadas pelo epitélio brônquico, tais como RANTES, eotaxina, interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), ou pelo aumento de receptores de adesão presentes no epitélio e no

endotélio, tais como ICAM-1 (SANMUGALINGHAM *et al*, 2000) e VCAM-1 (BROIDE *et al*, 2001). É possível que os AGPI n-3 afetem um (ou mais) destes fatores relacionados com a migração, a adesão e a ativação dos eosinófilos (YIN *et al*, 2009).

As células musculares lisas das vias aéreas tem muitas funções, podendo proliferar, migrar, contrair e sintetizar matriz extracelular, citocinas e quimiocinas. Por causa desse comportamento multifuncional, essas células estão emergindo como alvos terapêuticos para o tratamento de asma (WATANABE *et al*, 2009). A contração da musculatura lisa das vias aéreas leva a uma limitação do fluxo de ar, sendo o sintoma mais importante da doença (KUDO *et al*, 2013). Os estudos que encontraram efeitos da suplementação com óleo de peixe na asma enfatizam a quimiotaxia de leucócitos e a produção de mediadores inflamatórios por leucócitos. Devido a relevância da funcionalidade do músculo liso das vias aéreas para a asma, o presente estudo investigou os efeitos do óleo de peixe sobre a contração do músculo liso das vias aéreas. A inflamação asmática *per se* alterou a força de contração do MLA neste estudo, um efeito que poderia estar ligado ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , assim como à infiltração de eosinófilos no pulmão. Há evidências de que esses fatores em conjunto são capazes de modificar a contração do MLA (BLACK *et al*, 2012; ROSENWASSEN, 1998; ZHANG *et al*, 2009; PARRIS *et al*, 1999). A menor força de contração no MLA de ratos asmáticos neste estudo pode ser explicada pela remoção do MLA do meio inflamatório: como o músculo liso estava pré-contraído neste ambiente, este pode ter uma resposta fraca quando desafiado com Ach. No grupo controle, onde a inflamação estava ausente, o músculo liso pode apresentar uma força normal de contração. O efeito direto do óleo de peixe na resposta do MLA à Ach pode ser devido à modificação de fatores de transdução (MORIN *et al*, 2010) e/ou à incorporação de ácidos graxos para o músculo liso (SENOUVO *et al*, 2011). Jo e colaboradores (2005) demonstraram que os ácidos graxos presentes no óleo de peixe são incorporados na membrana das células dos músculos das vias respiratórias e, consequentemente, agem reduzindo os níveis de mRNA de canais de sódio dependentes de voltagem. Uma vez que não houve qualquer evidência de alterações estruturais indicativas de aumento no espessamento da parede das vias respiratórias, neste modelo, os efeitos da asma e do óleo de peixe sobre a força de contração do MLA parecem ser importantes observações.

Embora a suplementação com óleo de peixe não tenha resultado em diferença na força de contração do MLA em ratos asmáticos, houve uma redução do relaxamento em resposta ao Isoproterenol. Isso indica que os AGPI n-3 atuam sobre a contração e o relaxamento da musculatura lisa por mecanismos diferentes. Na asma, a hiper-responsividade do MLA é mais fortemente determinada pelo aumento dos estímulos que promovem a contração do músculo do que pelos estímulos que resultam no relaxamento (YIM *et al*, 2011; FRYER; JACOBY, 1998; VERBOUT *et al*, 2009; SOLWAY; FREDBERG, 1997; GALLOS *et al*, 2008; COOPER *et al*, 2009). Em conjunto, esses resultados indicam que a suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos tem uma ação limitada sobre a função do MLA. A redução do relaxamento do músculo em resposta ao Isoproterenol promovido pelo óleo de peixe poderia interferir com o tratamento clínico em ataques de asma, uma vez que o Isoproterenol é utilizado para relaxamento imediato das vias aéreas e liberação do fluxo de ar (GALLOS *et al*, 2008). Assim, a suplementação de indivíduos asmáticos com óleo de peixe pode reduzir a resposta a este broncodilatador, tendo um efeito adverso sobre o controle dos ataques de asma. No entanto, ainda são necessárias investigações clínicas sobre esses efeitos.

A literatura mostra uma relação entre a hiper-responsividade do MLA e a complacência pulmonar (MITZNER *et al*, 1992). Além de reduzir o diâmetro das vias aéreas (BENAYOUN *et al*, 2003; SHARDONOFKY *et al*, 2006; PELLEGRINO *et al*, 2009; RAQEEB *et al*, 2012), o aumento da tensão do MLA reduz a complacência, o que afeta as funções respiratórias na asma (MITZNER *et al*, 1992, KELLY *et al*, 2012). De fato, nos animais asmáticos, em que a inflamação e a hiper-responsividade do músculo liso das vias aéreas estão presentes, a complacência pulmonar foi reduzida. Apesar da suplementação com óleo de peixe nos animais asmáticos não ter afetado a força de contração, a complacência pulmonar aumentou nesses animais. A presença de muco nas vias aéreas também afeta a complacência estática (RUBIN, 2010), porém neste estudo essa relação não foi observada. Embora a asma tenha aumentado a quantidade de muco nas vias aéreas, a suplementação da dieta com óleo de peixe em animais asmáticos foi ineficaz em reduzir a quantidade de muco presente nos bronquíolos. Como a quantidade de muco e as concentrações das citocinas inflamatórias não foram alteradas pela suplementação com óleo de peixe em animais asmáticos, é possível que outros fatores tenham contribuído para o aumento da complacência pulmonar.



Para saber se a falta de efetividade no músculo liso das vias aéreas estava relacionada com uma ação incompleta do óleo de peixe sobre a inflamação característica da asma, também foram investigadas as concentrações de eicosanoides derivados do AA nos pulmões. O óleo de peixe é considerado um mediador de respostas anti-inflamatórias (WADA *et al*, 2007). As ações anti-inflamatórias do óleo de peixe, resultam de modificações nos mecanismos relacionados com a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana de células imunitárias (CALDER, 2008, CALDER, 2013). Um desses mecanismos é a modificação do padrão dos eicosanoides produzidos a partir de fosfolipídios da membrana das células inflamatórias. No presente estudo, a suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos reduziu a produção de  $\text{PGE}_2$  e de  $\text{TXA}_2$  no tecido pulmonar, o último medido pelas concentrações do seu produto metabólico estável, o  $\text{TXB}_2$ . Esta redução nos níveis de eicosanoides envolvidos na patogênese da asma ocorreu provavelmente pelos mecanismos já explicados para os efeitos do óleo de peixe em desordens inflamatórias. Os ácidos graxos presentes em grandes quantidades no óleo de peixe, tal como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexanoico (DHA), podem ser incorporados em membranas celulares, às custas do ácido araquidônico (MILES; CALDER, 2012). Esta alteração na composição de ácidos graxos do pulmão foi claramente demonstrada neste estudo. Os 21 dias de suplementação de óleo de peixe foram suficientes para reduzir as quantidades de AA e aumentar as de EPA e DHA nos pulmões dos ratos, tanto asmáticos como não asmáticos, o que resultou em níveis mais baixos dos eicosanoides derivados da oxidação do AA pela via da COX em asmáticos. Esta via enzimática é particularmente inibida pela competição de substratos resultante do aumento da presença de EPA e DHA nas membranas celulares (OBATA *et al*, 1999, WADA, 2007, CALDER, 2010b, NORRIS; DENNIS, 2012). O EPA e o DHA também podem dar origem a mediadores com menor potência inflamatória (CALDER, 2008, MILES; CALDER, 2012, WEYLANDT *et al*, 2012). Em modelos de asma induzida foi demonstrado que a Resolvina  $\text{E}_1$  promove a resolução da inflamação (HAWORTH *et al*, 2008). Neste estudo, as concentrações de Resolvina  $\text{E}_1$  ( $\text{RvE}_1$ ), no tecido pulmonar dos animais estudados foram inferiores ao limite de detecção. O EPA e o DHA são amplamente aceitos como os elementos que provocam os efeitos anti-inflamatórios dos AGPI n-3 (MILES; CALDER, 2012, WEYLANDT *et al* 2012). O presente estudo mostrou que, como EPA e DHA, o ácido docosapentaenoico (DPA)

foi aumentado no tecido pulmonar com suplementação de óleo de peixe. O DPA pode ser formado a partir do rápido alongamento do EPA em células inflamatórias, e conduzir à inibição da COX e modificação da produção de eicosanoides (NORRIS; DENNIS, 2012). Este derivado do EPA pode ser, portanto, parcialmente responsável pelos efeitos do óleo de peixe sobre as concentrações de  $\text{PGE}_2$  e  $\text{TXB}_2$  em ratos asmáticos.

A oxidação não enzimática de AA foi reduzida com a suplementação, no presente modelo de asma. Esta redução de 8-Isoprostanos  $\text{PGF}_{2\alpha}$  foi também relacionada com a incorporação de EPA e DHA e resultante redução de AA no tecido pulmonar. Isto está em conformidade com o estudo de Yin *et al* (2008), que encontraram níveis mais baixos de 8-Isoprostanos  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no pulmão de animais asmáticos induzidos por ovalbumina com a suplementação com óleo de peixe, como um resultado da incorporação de EPA e DHA. Os tromboxanos e isoprostanos da série 2 têm papéis relevantes sobre a inflamação asmática, aumentando a quimiotaxia de leucócitos, a secreção de muco e a hiper-responsividade brônquica a uma variedade de estímulos, e contribuindo para a obstrução das vias aéreas na asma (DAHLÉN *et al*, 1986; BARNES *et al*, 1998; ALLEN *et al* 2006; YIN *et al*, 2009; DUTT *et al*, 2011; CYPHERT *et al*, 2012). No entanto, a hiper-responsividade do MLA depende não só da redução dos níveis destes mediadores, que participam em respostas MLA, através da ativação de receptores  $\text{TP}_1$  e  $\text{TP}_2$  (VOYNOW; KUMMARAPURUGU, 2011), mas dos níveis de outros bronco-constritores mais potentes. Mesmo que a suplementação de óleo de peixe tenha reduzido a produção de  $\text{TXB}_2$  e de 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em condições basais, bem como após o desafio com OVA no presente estudo, o efeito global da suplementação com óleo de peixe nos animais asmáticos foi uma redução incompleta da inflamação. Isso pode ter contribuído para a falta de efeito do óleo de peixe sobre os níveis de citocinas inflamatórias nos pulmões, tais como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , e os fenômenos relacionados com a inflamação das vias respiratórias tais como a obliteração e a força de contração do MLA em ratos asmáticos. Assim, a diminuição dos níveis de 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{TXB}_2$  não foi suficiente para diminuir a resposta inflamatória no pulmão de ratos asmáticos suplementados com óleo de peixe.

Apesar das prostaglandinas da série 2 apresentarem um efeito deletério na inflamação, já que estão associadas com o aumento da permeabilidade vascular e a

infiltração de células nos pulmões (TILLEY *et al*, 2003; ALMISHRI *et al*, 2005), a Prostaglandina  $E_2$ , em particular, tem demonstrado ação anti-inflamatória e broncoprotetora na asma (HARTNEY *et al*, 2006; LUNDEQUIST *et al*, 2010). Assim, a diminuição dos níveis de  $PGE_2$  observada com a suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos pode não significar um efeito anti-inflamatório, como acontece em várias outras desordens com componente inflamatório. De fato, alguns trabalhos mostram que a redução da síntese de  $PGE_2$  como resultado da inibição da COX resulta em resposta  $Th_2$  aumentada, o que promove o aumento da inflamação alérgica das vias respiratórias asmáticas e a hiper-responsividade (MARTIN *et al*, 2002; PEEBLES JR *et al*, 2005; ZHOU *et al*, 2008). Esta resposta está relacionada com a produção de IL-5 e IL-13, citocinas inflamatórias que são reguladoras críticas da eosinofilia nas vias respiratórias e da hiper-responsividade. Yin *et al* (2009), encontraram uma relação entre a diminuição dos níveis de  $PGE_2$  com o aumento da produção de citocinas inflamatórias em animais asmáticos suplementados com óleo de peixe e Aggarwal *et al* (2010) mostraram a associação da redução da  $PGE_2$  com a inflamação eosinofílica em asmáticos. Assim, a redução dos níveis de  $PGE_2$  encontrada no estudo corrente poderia estar relacionada com o aumento da eosinofilia no LBA de ratos asmáticos suplementados com óleo de peixe. Além disso, a redução dos níveis de  $PGE_2$  pode também relacionar-se com a hiper-responsividade na asma, uma vez que o tônus e a responsividade da musculatura lisa das vias aéreas podem ser modulados pela  $PGE_2$  (WATSON *et al*, 1997; HARTNEY *et al*, 2006). A diferença entre os níveis de  $PGE_2$ , maiores na inflamação brônquica do que na asma, pode ser crucial para a hiper-responsividade que está presente apenas na asma (SASTRE *et al*, 2008).

A suplementação com óleo de peixe reduziu a concentração de  $LXA_4$  na asma, o que pode ser ou um efeito direto da redução na disponibilidade de AA para a síntese de lipoxinas, ou um efeito indireto da redução de  $PGE_2$ . A redução dos níveis de  $PGE_2$  com a suplementação também pode ter afetado a produção de  $LXA_4$  na asma, uma vez que a  $PGE_2$  estimula a síntese e liberação dessas lipoxinas (LEVY *et al*, 2001; CALDER, 2006), desviando a síntese predominante de  $LTB_4$  pela 5-LOX para a síntese de  $LXA_4$  pela 15-LOX (LEVY *et al*, 2001; HAWORTH; LEVY, 2007). A  $LXA_4$  é um importante mediador da resolução da inflamação asmática, pois além de reduzir a quimiotaxia das células polimorfonucleares, induz a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos nos pulmões. Assim, a redução da capacidade

fagocitária dos macrófagos alveolares nos animais asmáticos suplementados pode ser um resultado da diminuição de LXA<sub>4</sub>. Levando-se em consideração que a resolução da inflamação não depende somente da redução dos eicosanoides inflamatórios, mas também da produção das lipoxinas, e que a LXA<sub>4</sub> na asma tem papel na melhora dos sintomas (BONNANS; LEVY, 2007), esses resultados em conjunto podem contribuir para explicar a falta de efetividade da suplementação com óleo de peixe em asmáticos.

O aumento da síntese de leucotrienos, é um fator importante para a resposta inflamatória na asma aguda. O LTB<sub>4</sub> é um fator fundamental que promove a exacerbação da asma, produzindo edema e aumento da secreção de muco e há cada vez mais evidências de seu papel na resposta do músculo liso das vias aéreas (WATSON *et al*, 1997; WATANABE *et al*, 2009; HALLSTRAND; HENDERSON, 2010). Neste trabalho, a suplementação com óleo de peixe não reduziu os níveis de LTB<sub>4</sub> nos pulmões de ratos asmáticos, apesar da modificação do perfil de ácidos graxos dos pulmões. Isto sugere que a síntese de leucotrienos na asma não depende apenas da disponibilidade de substratos, mas da regulação enzimática. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a inibição da via da COX poderia reforçar a produção de leucotrienos, através do aumento da disponibilidade de substrato para 5-LOX (HAMAD *et al*, 2004; NORRIS; DENNIS, 2012) e pode aumentar a razão entre metabólitos do AA produzidos a partir de 5-LOX e a partir da COX-1 (NORRIS; DENNIS, 2012). Assim, mesmo que a suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos possa melhorar o fornecimento de EPA e DHA para a síntese de eicosanoides que participam da resolução da inflamação, a diminuição da disponibilidade de AA não reduziu os níveis de LTB<sub>4</sub>. Estes resultados podem ser relevantes para a falta de eficácia do óleo de peixe demonstrado sobre a funcionalidade do MLA. Quantidade considerável de estudos demonstra que os leucotrienos são os maiores constritores de MLA e são essenciais para várias manifestações clínicas da asma (WATSON *et al*, 1997; MOQBEL, 1999; WATANABE *et al*, 2009).

A avaliação das concentrações de eicosanoides mostram que a suplementação com óleo de peixe reduziu os mediadores inflamatórios derivados da oxidação de AA pela COX e vias não enzimáticas no pulmão de ratos asmáticos, como resultado da competição do EPA e DHA com AA. No entanto, a produção de leucotrienos, derivados da oxidação de AA pela via da 5-LOX não foi alterada.

Assim, o efeito anti-inflamatório do óleo de peixe na asma foi incompleto, uma vez que os leucotrienos atuam sobre a contração do MLA, que tem um papel fundamental na principal característica da asma, a hiper-responsividade brônquica.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o óleo de peixe afetou algumas respostas inflamatórias (infiltração de leucócitos para os pulmões e concentração de  $\text{TXB}_2$ , 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) mas não outras (eosinofilia no LBA, as concentrações de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  nos pulmões e a concentração de  $\text{LTB}_4$ ) e melhorou alguns fenômenos relacionados com a inflamação das vias aéreas (complacência pulmonar estática), mas não outros (obliteração e força de contração do MLA). Estes efeitos diferenciados podem ser devidos à dose de AGPI n-3 que foi administrada ou à curta duração da suplementação. Esta última pode ser particularmente importante para o músculo liso que pode levar mais de 21 dias para incorporar AGPI n-3 o suficiente para influenciar a sua função. É importante notar, entretanto, que a dose diária de 1g /kg de peso corporal é elevada em comparação com as doses utilizadas em estudos humanos (CALDER, 2012a; THIEN *et al*, 2002).

Assim, a eficácia da suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos demonstrou ser limitada por uma ação ineficiente em parâmetros associados com a função do MLA, que podem relacionar-se tanto a uma redução incompleta da inflamação ou a uma resistência do MLA para os efeitos dos AGPI n-3. Esta falta de efeito pode estar relacionada à dose de AGPI n-3 que foi administrada ou ao curto prazo da suplementação.

## 6 CONCLUSÕES

o óleo de peixe afetou algumas respostas inflamatórias (infiltração de leucócitos para os pulmões e concentração de  $\text{TXB}_2$ , 8-Iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) mas não outras (eosinofilia no LBA, as concentrações de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  nos pulmões e a concentração de  $\text{LTB}_4$ ) e melhorou alguns fenômenos relacionados com a inflamação das vias aéreas (complacência pulmonar estática), mas não outros (obliteração e força de contração do MLA).

Assim, a eficácia da suplementação com óleo de peixe em ratos asmáticos demonstrou-se limitada por uma ação ineficiente no músculo liso das vias aéreas no modelo de asma proposto. Essa ação limitada parece ser decorrente da falta de efeito na modulação que o óleo de peixe exerce sobre as concentrações de leucotrieno  $\text{B}_4$  na asma ou da resistência do MLA aos efeitos dos AGPI n-3.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S., MOODLEY, Y. P., THOMPSON, P. J., MISSO, N. L. Prostaglandin E<sub>2</sub> and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. **Clin Exp Allergy**, 40(1): 85-93, 2010.
- ALLEN, I. C., HARTNEY, J. M., COFFMAN, T. M., PENN, R. B., WESS, J., KOLLER, B. H. Thromboxane A<sub>2</sub> induces airway constriction through an M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor-dependent mechanism. **J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 290(3): L526-L533, 2006.
- ALMISHRI, W., COSSETTE, C., ROKACH, J., MARTIN, J. G., HAMID, Q., POWELL, W. S. Effects of prostaglandin D<sub>2</sub>, 15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub>, and selective DP<sub>1</sub> and DP<sub>2</sub> receptor agonists on pulmonary infiltration of eosinophils in Brown Norway rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 313(1): 64-69, 2005.
- ANDERSON, S. D. Indirect challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. **Chest**, 138(2 Suppl): 25S-30S, 2010.
- ARM, J. P., HORTON, C. E., MENCIA-HUERTA, J. M., HOUSE, F., EISER, N. M., CLARK, T. J. H., SPUR, B. W., LEE, T. H. Effect of dietary supplementation with fish oil lipids on mild asthma. **Thorax**, 43: 84-92, 1988.
- BABU, S. K., PUDDICOMBE, S. M., ARSHAD, H. H., WILSON, S. J., WARD, J., GOZZARD, N., HIGGS, G., HOLGATE, S. T., DAVIES, D. E. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. **Clin Immunol**, 140(1): 18-25, 2011.
- BARALDI, E., CARRARO, S., ALINOVI, R., PESCI, A., GHIRO, L., BODINI, A., PIACENTINI, G., ZACCHELLO, F., ZANCONATO, S. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. **Thorax**, 58: 505–509, 2003.
- BARNES, P. J. Biochemical basis of asthma therapy. **J Biol Chem**, 286(38): 32899-32905, 2011.
- BARNES, P. J., CHUNG, K. F., PAGE C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol Rev**, 50: 515–596, 1998.
- BARRIOS, R. J., KHERADMAND, F., BATTS, L., CORRY, D. B. Asthma: pathology and pathophysiology. **Arch Pathol Lab Med**, 130: 447–451, 2006.
- BATES, J. H. T., RINCON, M., IRVIN, C. G. Animal models of asthma. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 297: L401–L410, 2009.
- BELVISI, M. G., SAUNDERS, M. A., HADDAD, E-B., HIRST, S. J., YACOUB, M. H., BARNES, P. J., MITCHELL, J. A. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. **Br J Pharmacol**, 120: 910-916, 1997.

BENAYOUN, L. D. R., UILHE, A., DOMBRET, M. C., AUBIER, M., PRETOLANI, M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, 167: 1360 - 1368, 2003.

BHAKTA, N. R., WOODRUFF, P. G. Human asthma phenotypes: from the clinic, to cytokines, and back again. **Immunol Rev**, 242(1): 220-232, 2011.

BLACK, J. L., PANETTIERIJR, R. A., BANERJEE, A., BERGER, P. Airway smooth muscle in asthma — just a target for bronchodilation? **Clin Chest Med**, 33: 543–558, 2012.

BOCHNER, B. S., UNDEM, B. J., LICHTENSTEIN, L. M. Immunological aspects of allergic asthma. **Annu Rev Immunol**, 12: 295-335, 1994.

BOERO, S., SILVESTRI, M., ULLMANN, N., ROSSI, G. A. Modulation by flunisolide of tumor necrosis factor-alpha-induced stimulation of airway epithelial cell activities related to eosinophil inflammation. **J Asthma**, 47(4): 381-387, 2010.

BONNANS, C., LEVY, B. D. Lipid mediators as agonists for the resolution of acute lung Inflammation and injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 36: 201–205, 2007.

BORTOLOTTI, L. A., CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Beta-bloqueadores adrenérgicos. **Rev Bras Hipertens**, 16(4): 215-220, 2009.

BRADDING, P., ROBERTS, J. A., BRITTEN, K. M., MONTEFORT, S., DJUKANOVIC, R., MUELLER, R., HEUSSER, C. H., HOWARTH, P. H., HOLGATE, S. T. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 10(5): 471-80, 1994.

BREWSTER, C. E., HOWARTH, P. H., DJUKANOVIC, R., WILSON, J., HOLGATE, S. T., ROCHE, W. R. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 3(5): 507-511, 1990.

BROIDE, D. H., STACHNICK, G., CASTANEDA, D., NAYAR, J., SRIRAMARAO, P. Inhibition of eosinophilic inflammation in allergen-challenged TNF receptor p55/p75 and TNF receptor p55-deficient mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 24(3): 304-311, 2001.

BURKE, J. E., DENNIS E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 50 (S): S237–S242, 2009.

CALDER, P. C., YAQOOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **Biofactors**, 35(3): 266-272, 2009.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation – from the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. **Clin Nutr**, 29: 5-12, 2010a.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: the cutting edgebetween food and pharma. **Eur J Pharmacol**, 668: S50–S58, 2011.

CALDER, P. C. Long-chain fatty acids and inflammation. **Proc Nutr Soc**, 71 (2): 284–289, 2012a.



CALDER, P. C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **J Nutr**, 142 (3): 592S-599S, 2012b.

CALDER, P. C. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **Am J Clin Nutr**, 83: 1505S–15119S, 2006.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutrients**, 2: 355–374, 2010b.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **Brit J Clin Pharmacol**, 75: 645–662, 2013.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, 2009.

CALDER, P. C. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Fatty acids and inflammation - From the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. **Clin Nut**, 29: 5–12, 2010c.

CALDER, P. C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 79(3-5): 101-108, 2008.

CARROLL, N. G., MUTAVDZIC, S., JAMES, A. L. Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. **Thorax**, 57: 677–682, 2002.

CHAI, O. H., HAN, E. H., LEE, H. K., SONG, C. H. Mast cells play a key role in Th<sub>2</sub> cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF- $\alpha$ . **Exp Mol Med**, 43: 35–43, 2011.

CHANEZ, P., WENZEL, S. E., ANDERSON, G. P., ANTO, J. M., BEL, E. H., BOULET, L. P., BRIGHTLING, C. E., BUSSE, W. W., CASTRO, M., DAHLEN, B., DAHLEN, S. E., FABBRI, L. M., HOLGATE, S. T., HUMBERT, M., GAGA, M., JOOS, G. F., LEVY, B., RABE, K. F., STERK, P. J., WILSON, S. J., VACHIER, I. Severe asthma in adults: what are the important questions? **J Allergy Clin Immunol**, 119(6): 1337-1348, 2007.

CHEN, S. Natural products triggering biological targets – a review of the anti-inflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis. **Curr Drug Targets**, 12: 288–301, 2011.

CHO, J. Y. Recent advances in mechanisms and treatments of airway remodeling in asthma: a message from the bench side to the clinic. **Korean J Intern Med**, 26(4): 367-383, 2011.

CHUNG, K. F., BARNES, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**, 54(9): 825-857, 1999.

CIEBIADA, M., GORSKA-CIEBIADA, M., GORSKI, P. sICAM-1 and TNF- $\alpha$  in asthma and rhinitis: relationship with the presence of atopy. **J Asthma**, 48(7): 660-666, 2011.

COOPER, C. B., BOSCARDIN, W. J., COLTHURST, J. R., KLEERUP, E. C. Treatment of mild persistent asthma by cutaneous electronic stimulation. **Eur Respir J**, 34:515–517, 2009a.

COOPER, P. R., MCPARLAND, B. E., MITCHELL, H. W., NOBLEC, P.B., POLITI, A. Z., RESSMEYER, A. R., WEST, A. R. Airway mechanics and methods used to visualize smooth muscle dynamics in vitro. **Pulm Pharmacol Ther**, 22(5): 398–406, 2009b.

CYPHERT, J. M., ALLEN, I. C., CHURCH, R. J., LATOUR, A. M., SNOUWAERT, J. N., COFFMAN, T. M., KOLLER, B. H. Allergic inflammation induces a persistent mechanistic switch in thromboxane-mediated airway constriction in the mouse. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 302(1): L140–L151, 2012.

DAHLÉN, S. E., KUMLIN, M., GRANSTRÖM, E., HEDQVIST, P. Leukotrienes and other eicosanoids as mediators of airway obstruction. **Respiration**, 50 (2): 22-29, 1986.

DAMERA, G., TLIBA, O., PANETTIERI Jr, R. A. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. **Pulm Pharmacol Ther**, 22(5): 353–359, 2009.

DOUGHERTY, R. H., FAHY, J. V. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. **Clin Exp Immunol**, 39: 193–202, 2009.

DRAGON, S., RAHMAN, M. S., YANG, J., UNRUH, H., HALAYKO, A. J., GOUNNI, A. S. IL-17 enhances IL-1 $\beta$ -mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 292: L1023–L1029, 2007.

DURRANT, D. M., METZGER, D. W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. **Immunol Invest**, 39 (0): 526-549, 2010.

DUTT, H. K., GAUR, S., KUMAR, A., GOSWAMI, S. Oxidative stress in bronchial asthma: a clinical study. **J Appl Pharm Sci**, 1: 145–914, 2011.

ELIAS, J. A., LEE, C. G., ZHENG, T., MA, B., HOMER, R. J., ZHU, Z. New insights into the pathogenesis of asthma. **J Clin Invest**, 111(3): 291-297, 2003.

ELLIS, J., UNDEM, B. Role of cysteinyl leukotrienes and histamine in mediating intrinsic tone in isolated human bronchi. **Am J Respir Crit Care Med**, 149 118–122, 1994.

EVANS, J. F., FERGUSON, A. D., MOSLEY, R. T., HUTCHINSON, J. H. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. **Trends Pharmacol Sci**, 29, 72–78, 2008.

FETTERMAN, J. W. Jr, ZDANOWICZ, M. M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **Am J Health Syst Pharm**, 66: 1169-1179, 2009.

FINKELMAN, F. D., HOGAN, S. P., HERSHEY, G. K., ROTHENBERG, M. E., WILLS-KARP, M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. **J Immunol**, 184(4): 1663-1674, 2010.

FIXMAN, E. D., STEWART, A., MARTIN, J. G. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. **Eur Respir J**, 29: 379–389, 2007.

FOSTER, H. R., FUERST, E., LEE, T. H., COUSINS, D. J., WOSZCZEK, G. Characterisation of P2Y<sub>12</sub> receptor responsiveness to cysteinyl leukotrienes. **PLoS ONE**, 8(3): e58305, 2013.

FRYER, A. D., JACOBY, D. B. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. **Am J Respir Crit Care Med**, 158: S154–S160, 1998.

GALLOS, G., GLEASON, N. R., ZHANG, Y., PAK, S. W., SONETT, J. R., YANG, J., EMALA, C.W. Activation of endogenous GABAA channels on airway smooth muscle potentiates isoproterenol-mediated relaxation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 295: L1040– L1047, 2008.

GIUDETTI, A. M., CAGNAZZO, R. Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 99(3-4): 57-67, 2012.

GLEICH, G. J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 105:651–663, 2000.

GRIGORAȘ, A., CĂRUNTU, I., GRIGORAȘ, C. C., MIHĂESCU, T., AMĂLINEI, C. Relationship between immunohistochemical assessment of bronchial mucosa microvascularization and clinical stage in asthma. **Rom J Morphol Embryol**, 53(3): 485–490, 2012.

GRÜNIG G., WARNOCK M., WAKIL A. E., VENKAYYA R., BROMBACHER F., RENNICK D. M., SHEPPARD D., MOHRS M., DONALDSON D. D., LOCKSLEY R. M., CORRY D. B. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. **Science**, 282: 2261–2263, 1998.

GUNDEL, R. H., WEGNER, C. D., TORCELLINI, C. A., CLARKE, C. C., HAYNES, N., ROTHLEIN, R., SMITH, C. W., LETTS, L. G. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys. **J Clin Invest**, 88(4): 1407-1411, 1991.

GYLLFORS, P., DAHLÉN, S.E., KUMLIN, M., LARSSON, K., DAHLÉN, B. Bronchial responsiveness to leukotriene D<sub>4</sub> is resistant to inhaled fluticasone propionate. **J Allergy Clin Immunol**, 118: 78–83, 2006.

HALDAR, P., BRIGHTLING, C. E., HARGADON, B., GUPTA, S., MONTEIRO, W., SOUSA, A., MARSHALL, R. P., BRADDING, P., GREEN, R. H., WARDLAW, A. J., PAVORD, I. D. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. **N Engl J Med**, 360: 973–984, 2009.

HALLSTRAND, T. S., HENDERSON JR, W. R. An update on the role of leukotrienes in asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 10(1): 60–66, 2010.

HAMAD, A. M., SUTCLIFFE, A. M., KNOX, A. J. Aspirin-induced asthma: clinical aspects, pathogenesis and management. **Drugs**, 64: 2417–2432, 2004.

HARTNEY, J. M., COGGINS, K. G., TILLEY, S. L., JANIA, L. A., LOVGREN, A. K., AUDOLY, L. P., KOLLER, B. H. Prostaglandin E<sub>2</sub> protects lower airways against bronchoconstriction. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 290: L105–L113, 2006.

HAWORTH, O., CERNADAS, M., YANG, R., SERHAN, C. N., LEVY, B. D. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. **Nat Immunol**, 9(8): 873-879, 2008.

HAWORTH, O., LEVY, B. D. Endogenous lipid mediators in the resolution of airwayinflammation. **Eur Respir J**, 30: 980–992, 2007.

HOLGATE, S. T. A brief history of asthma and its mechanisms to modern concepts of disease pathogenesis. **Allergy Asthma Immunol Res**, 2(3): 165-171, 2010.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nat Med**, 18 (5): 673-683, 2012.

HOLLOWAY, J. W., YANG, I. A., HOLGATE, S. T. Genetics of allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 125 (2 Suppl), S81-S94, 2010.

HOLTMANN, M. H., NEURATH, M. F. Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. **Curr Mol Med**, 4: 439–444, 2004.

HOMER, R. J., ELIAS, J. A. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. **Physiology**, 20: 28-35, 2005.

HOWARTH, P. H., BABU, K. S., ARSHAD, H. S., LAU, L., BUCKLEY, M., MCCONNELL, W., BECKETT, P., AL ALI, M., CHAUHAN, A., WILSON, S. J., REYNOLDS, A., DAVIES, D. E., HOLGATE, S. T. Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. **Thorax**, 60: 1012–1018, 2005.

JACOBSEN, E. A., HELMERS, R. A., LEE, J. J., LEE, N. A. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, 120: 1–33, 2012.

JAMES, A. J., LACKIE, P.M., CAZALY, A.M., SAYERS, I., PENROSE, J.F., HOLGATE, S.T., SAMPSON, A.P. Human bronchial epithelial cells express an active and inducible biosynthetic pathway for leukotriene B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub>. **Clin Exp Allergy**, 37: 880–892, 2007.

JAMES, A. L., MAXWELL, P. S., PEARCE-PINTO, G., ELLIOT, J. G., CARROLL, N. G. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, 166: 1590 –1595, 2002.

JANSSEN, L. J. Isoprostanes: Generation, pharmacology, and roles in free-radical-mediated effects in the lung. **Pulm Pharmacol Ther**, 13: 149–155, 2000.

JO, T., IIDA, H., KISHIDA, S., IMUTA, H., OONUMA, H., NAGATA, T., HARA, H., IWASAWA, K., SOMA, M., SATO, Y., NAGASE, T., NAGAI, R., NAKAJIMA, T. Acute and chronic effects of eicosapentaenoic acid on voltage-gated sodium channel expressed in cultured human bronchial smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 331: 1452–1459, 2005.

JUNG, J., KO, S. H., YOO DO, Y., LEE, J. Y., KIM, Y. J., CHOI, S. M., KANG, K. K., YOON, H. J., KIM, H., YOUN, J., KIM, J. M. 5,7-Dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone inhibits intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 via the Akt and nuclear factor-κB-dependent pathway, leading to suppression of

adhesion of monocytes and eosinophils to bronchial epithelial cells. **Immunology**, 137(1): 98-113, 2012.

KELLY, V. J., BROWN, N. J., SANDS, S. A., BORG, B. M., KING, G. G., THOMPSON, B. R. Effect of airway smooth muscle tone on airway distensibility measured by the forced oscillation technique in adults with asthma. **J Appl Physiol**, 112: 1494–1503, 2012.

KHARITONOV, S. A., DONNELLY, L. E., MONTUSCHI, P., CORRADI, M., COLLINS, J. V., BARNES, P. J. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. **Thorax**, 57: 889–896, 2002.

KIM, H. Y., DEKRUYFF, R. H., UMETSU, D. T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. **Nat Immunol**, 11(7): 577-584, 2010.

KLINE, J. N., HUNNINGHAKE, G. W. T-lymphocyte dysregulation in asthma. **Proc Soc Exp Biol Med**, 207(3): 243-253, 1994.

KUDO, M., ISHIGATSUBO, Y., AOKI, I. Pathology of asthma. **Front Microbiol**, 4: 263, 2013.

LASSALLE, P., GOSSET, P., DELNESTE, Y., TSICOPOULOS, A., CAPRON, A., JOSEPH, M., TONNEL, A. B. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor- $\alpha$ . **Clin Exp Immunol**, 94: 105–110, 1993.

LEVY, B.D. Lipoxins and lipoxin analogs in asthma. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids**, 73: 231–237, 2005.

LEVY, B.D., DE SANCTIS, G.T., DEVCHAND, P.R., KIM, E., ACKERMAN, K., SCHMIDT, B. A., SZCZEKLIK, W., DRAZEN, J. M., SERHAN, C. N. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). **Nat Med**, 8: 1018–1023, 2002.

LIU, M. C., BLEECKER, E. R., LICHTENSTEIN, L. M., KAGEY-SOBOTKA, A., NIV, Y., MCLEMORE, T. L., PERMUTT, S., PROUD, D., HUBBARD, W. C. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D<sub>2</sub>, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. **Am Rev Respir Dis**, 142(1): 126-132, 1990.

LIU, T., LAIDLAW, T. M., FENG, C., XING, W., SHEN, S., MILNE, G. L., BOYCE, J. A. Prostaglandin E<sub>2</sub> deficiency uncovers a dominant role for thromboxane A<sub>2</sub> in house dust mite-induced allergic pulmonary inflammation. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109 (31): 12692–12697, 2012.

LLOYD, C. M., HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)<sub>2</sub> cells. **Nat Rev Immunol**, 10(12): 838-848, 2010.

LOCKE, N. R., ROYCE, S. G., WAINWRIGHT, J. S., SAMUEL, C. S., TANG, M. L. Comparison of Airway Remodeling in Acute, Subacute, and Chronic Models of Allergic Airways Disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 36: 625–632, 2007.

LOCKSLEY, R. M. Asthma and allergic inflammation. **Cell**, 140(6): 777-783, 2010.

LUNDEQUIST A., NALLAMSHETTY, S. N., XING, W., FENG, C., LAIDLAW, T. M., UEMATSU, S., AKIRA, S., BOYCE, J. A. Prostaglandin E<sub>2</sub> exerts homeostatic regulation of pulmonary vascular remodeling in allergic airway inflammation. **J Immunol**, 184(1): 433-441, 2010.

MANKAN, A. K., LAWLESS, M. W., GRAY, S. G., KELLEHER, D., MCMANUS, R. NF-κB regulation: the nuclear response. **J Cell Mol Med** 13: 631–643, 2009.

MARTIN J. G., SUZUKI, M., MAGHNI, K., PANTANO, R., RAMOS-BARBÓN, D., IHAKU, D., NANTEL, F., DENIS, D., HAMID, Q., POWELL, W. S. The immunomodulatory actions of prostaglandin E<sub>2</sub> on allergic airway responses in the rat. **J Immunol**, 169(7): 3963-3969, 2002.

MARTIN, J. G., DUGUET, A., EIDELMAN, D. H. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. **Eur Respir J**, 16: 349-354, 2000.

MATANGKASOMBUT, P., PICHAVANT, M., DEKRUYFF, R. H., UMETSU, D. T. Natural killer T cells and the regulation of asthma. **Mucosal Immunol**, 2: 383–392, 2009.

MEDOFF, B. D., SEUNG, E., HONG, S., THOMAS, S. Y., SANDALL, B. P., DUFFIELD, J. S., KUPERMAN, D. A., ERLE, D. J., LUSTER, A. D. CD11b<sup>+</sup> myeloid cells are the key mediators of Th<sub>2</sub> cell homing into the airway in allergic inflammation. **J Immunol**, 182(1): 623-635, 2009.

MEILER, F., ZIMMERMANN, M., BLASER, K., AKDIS, C. A., AKDIS, M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, 6: 91–96, 2006.

MICKLEBOROUGH, T. D., LINDLEY, M. R., IONESCU, A. A., FLY, A. D. Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. **Chest**, 129: 39-49, 2006.

MILES, E. A., CALDER, P. C. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. **Br J Nutr**, 107 (2): S171-S184, 2012.

MITZNER, W., BLOSSER, S., YAGER, D., WAGNER, E. Effect of bronchial smooth muscle contraction on lung compliance. **J Appl Physiol**, 72: 158–167, 1992.

MONTUSCHI, P., CORRADI, M., CIABATTONI, G., NIGHTINGALE, J., KHARITONOV, S. A., BARNES, P. J. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. **Am J Respir Crit Care Med**, 160: 216–220, 1999.

MONTUSCHI, P., PETERS-GOLDEN, M. L. Leukotriene modifiers for asthma treatment. **Clin Exp Allergy**, 40(12): 1732-1741, 2010.

MOQBEL, R. Leukotriene receptor antagonists in the treatment of asthma: implications for eosinophilic inflammation. **Can Respir J**, 6(5): 453-457, 1999.

MORIN, C, FORTIN, S., CANTIN, A. M., ROUSSEAU, E. Docosahexaenoic acid derivative prevents inflammation and hyperreactivity in lung: implication of PKC-potentiated inhibitory protein for heterotrimeric myosin light chain phosphatase of 17 kD in asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 45:366–375, 2011.

NAKAE, S., HO, L. H., YU, M., MONTEFORTE, R., IIKURA, M., SUTO, H., GALLI, S. J. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH<sub>2</sub> cytokine production in an asthma model in mice. **J Allergy Clin Immunol**, 120:48–55, 2007.

NAKAE, S., SUTO, H., KAKURAI, M., SEDGWICK, J. D., TSAI, M., GALLI, S. J. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102: 6467–6472, 2005.

NAM, H. S., LEE, S. Y., KIM, S. J., KIM, J. S., KWON, S. S., KIM, Y. K., KIM, K. H., MOON, H. S., SONG, J. S., PARK, S. H., KIM, S. C. The soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor suppresses airway inflammation in a murine model of acute asthma. **Yonsei Med J**, 50(4): 569-575, 2009.

NEGRI, J., EARLY, S. B., STEINKE, J. W., BORISH, L. Corticosteroids as inhibitors of cysteinyl leukotriene metabolic and signaling pathway. **J Allergy Clin Immunol**, 121: 1232–1237, 2008.

NOBLE, P. B., ANSELL, T. K., JAMES, A. L., MCFAWN, P. K., MITCHELL, H. W. Airway smooth muscle dynamics and hyperresponsiveness: In and outside the Clinic. **J Allergy (Cairo)**, 2012: 157047, 2012.

NORRIS, P. C., DENNIS, E. A. Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109(22): 8517-8522, 2012.

OBATA, T., NAGAKURA, T., MASAKI, T., MAEKAWA, K., YAMASHITA, K. Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D<sub>2</sub> generation by inhibiting cyclooxygenase-2 in cultured human mast cells. **Clin Exp Allergy**, 29: 1129–1135, 1999.

OKUNISHI, K., PETERS-GOLDEN, M. Leukotrienes and airway inflammation. **Biochim Biophys Acta**, 1810: 1096–1102, 2011.

OZIER, A., ALLARD, B., BARA, I., GIRODET, P. O., TRIAN, T., MARTHAN, R., BERGER, P. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. **J Allergy**, 2011: 1-20, 2011.

PARÉ, P. D., MCPARLAND, B. E., SEOW, C. Y. Structural basis for exaggerated airway narrowing. **Can J Physiol Pharmacol**, 85(7): 653-658, 2007.

PARRIS, J. R. M., COBBAN, H. J., LITTLEJOHN, A. F., MACEWAN, D. J., NIXON, G. F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. **J Physiol**, 518: 561–569, 1999.

PASCOE, C. D., WANG, L., SY Yong, H. T., PARÉ, P. D. A brief history of airway smooth muscle's role in airway hyperresponsiveness. **J Allergy (Cairo)**, 2012: 768982, 2012.

PASTERNYK, S. M., D'ANTONI, M. L., VENKATESAN, N., SIDDIQUI, S., MARTIN, J. G., LUDWIG, M. S. Differential effects of extracellular matrix and mechanical strain on airway smooth muscle cells from ovalbumin- vs saline-challenged Brown Norway rats. **Resp Physiol Neurobi**, 181: 36–43, 2012.

PEEBLES Jr, R.S., HASHIMOTO, K., MORROW, J. D., DWORSKI, R., COLLINS, R. D., HASHIMOTO, Y., CHRISTMAN, J. W., KANG, K-H., JARZECKA, K., FURLONG, J., MITCHELL, D. B., TALATI, M., GRAHAM, B. S., SELLER, J. R. Selective Cyclooxygenase-1 and -2 inhibitors each increase allergic inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, 165: 1154–1160, 2002.

PEEBLES Jr, R. S., HASHIMOTO, K., SELLER, J. R., MOORE, M. L., MORROW J. D., JI, S., ELIAS, J. A., GOLENIIEWSKA, K., O'NEAL, J., MITCHELL, D. B., GRAHAM, B. S., ZHOU, W. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-Lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. **J Immunol**, 175 (12): 8253–8259, 2005.

PELLEGRINO, R., POMPILIO, P., QUARANTA, M., ALIVERTI, A., KAYSER, B., MISEROCCHI, G., FASANO, V., COGO, A., MILANESE, M., CORNARA, G., BRUSASCO, V., DELLACA, R. Airway responses to methacholine and exercise at high altitude in healthy lowlanders. **J Appl Physiol**, 108:256–265, 2009.

PIPE, R. K., COLES, J. A., FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol**, 4: 93-100, 1995.

PLANAGUMA, A., LEVY, B. D. Uncontrolled airway inflammation in lung disease represents a defect in counter-regulatory signaling. **Future Lipidol**, 3(6): 697-704, 2008.

PLANT, P. J., NORTH, M. L., WARD, A., WARD, M., KHANNA, N., CORREA, J., SCOTT, J. A., BATT, J. Hypertrophic airway smooth muscle mass correlates with increased airway responsiveness in a murine model of asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 46 (4): 532–540, 2012.

RAMSAY, C. F., SULLIVAN, P., GIZYCKI, M., WANG, D., SWERN, A. S., BARNES, N. C., REISS, T. F., JEFFERY, P. K. Montelukast and bronchial inflammation in asthma: a randomised, double-blind placebo-controlled trial. **Respir Med**, 103: 995–1003, 2009.

RAQEEB, A., JIAO, Y., SY Yong, H. T., PARE, P. D., SEOW, C. Y. Regulatable stiffness in relaxed airway smooth muscle: a target for asthma treatment? **J Appl Physiol**, 112: 337–346, 2012.

REINHARDT, R. L., LIANG, H. E., LOCKSLEY, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. **Nat Immunol**, 10: 385–393, 2009.

REUTER, S., HEINZ, A., SIEREN, M., WIEWRODT, R., GELFAND, E. W., STASSEN, M., BUHL, R., TAUBE, C. Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. **Eur Respir J**, 31: 773–782, 2008.



RICCI, M., MATUCCI, A., ROSSI, O. T cells, cytokines, IgE and allergic airways inflammation. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 4(5): 214-20, 1994.

RICCIARDOLO, F. L., DI STEFANO, A., VAN KRIEKEN, J. H., SONT, J. K., VAN SCHADEWIJK, A., RABE, K. F., DONNER, C. F., HIEMSTRA, P. S., STERK, P. J., MAUAD, T. Proliferation and inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. **Clin Exp Allergy**, 33: 905–911, 2003.

RICCIOTTI, E., FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 31: 986–1000, 2011.

ROBINSON, D. S. Regulatory T cells and asthma. **Clin Exp Allergy**, 39: 1314–1323, 2009.

ROBINSON, D. S., BENTLEY, A. M., HARTNELL, A., KAY, A. B., DURHAM, S. R. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. **Thorax**, 48 (1): 26–32, 1993.

ROBINSON, D. S., HAMID, Q., YING, S., TSICOPOULOS, A., BARKANS, J., BENTLEY, A. M., CORRIGAN, C., DURHAM, S. R., KAY, A. B. Predominant TH<sub>2</sub>-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N Engl J Med**, 326: 298–304, 1992.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **J Exp Med**, 166: 1685–1701, 1987.

ROSENWASSER, L. J. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. **J Allergy Clin Immunol**, 102: 344–350, 1998.

RUBIN, A. H. E., SMITH, L. J., PATTERSON, R. The bronchoconstrictor properties of platelet-activating factor in humans. **Am Rev Respir Dis**, 136: 1145–1151, 1987.

RUBIN, B. K. Air and soul: the science and application of aerosol therapy. **Respir Care**, 55: 911–921, 2010.

SADIK, C. D., LUSTER, A. D. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. **J Leukoc Biol**, 91(2): 207–215, 2012.

SANMUGALINGHAM, D., DE VRIES, E., GAUNTLETT, R., SYMON, F. A., BRADDING, P., WARDLAW, A. J. Interleukin-5 enhances eosinophil adhesion to bronchial epithelial cells. **Clin and Experim Allergy**, 30: 255–263, 2000.

SASAKI, F., SAITOH, Y., VERBURGT, L., OKAZAWA, M. Airway wall dimensions during carbachol-induced bronchoconstriction in rabbits. **J Appl Physiol**, 81: 1578–1583, 1996.

SASTRE, B., DEL POZO, V. Role of PGE<sub>2</sub> in asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. **Mediators Inflamm**, 2012: 645383, 2012.

SASTRE, B., FERNÁNDEZ-NIETO, M., MOLLÁ, R., LÓPEZ, E., LAHOZ, C., SASTRE, J., DEL POZO, V., QUIRCE, S. Increased prostaglandin E<sub>2</sub> levels in the airway of patients with eosinophilic bronchitis. **Allergy**, 63(1): 58-66, 2008.

SCHIESSEL, D. L. **Ácido graxo  $\alpha$ -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária.** 2011. 106 f. Tese de Doutorado, Setor e Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SCHUSTER, M., TSCHERNIG, T., KRUG, N., PABST, R. Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the Brown Norway rat. **Am J Respir Crit Care Med**, 161: 558-566, 2000.

SCHWAB, J. M., CHIANG, N., ARITA, M., SERHAN, C. N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, 447(7146): 869–874, 2007.

SENOUVO, F. Y., TABET, Y., MORIN, C., ALBADINE, R., SIROIS, C., ROUSSEAU, E. Improved bioavailability of epoxyeicosatrienoic acids reduces TP-receptor agonist-induced tension in human bronchi. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 301: L675–L682, 2011.

SEROOGY, C. M., GERN, J. E. The role of T regulatory cells in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, 5: 996-999, 2005.

SHANMUGASUNDARAM, K. R., KUMAR, S. S., RAJAJEE, S. Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma. **Clin Chim Acta**, 305: 107-114, 2001.

SHARDONOFFSKY, F. R., CAPETANAKI, Y., BORIEK, A. M. Desmin modulates lung elastic recoil and airway responsiveness. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 290: L890–L896, 2006.

SHORE, S. A. Cytokine regulation of  $\beta$ -adrenergic responses in airway smooth muscle. **J Allergy Clin Immunol**, 110: S255-S260, 2002.

SHORE, S. A., MOORE, P. E. Effects of cytokines on contractile and dilator responses of airway smooth muscle. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 29(10): 859-866, 2002.

SHUM, B. O., ROLPH, M. S., SEWELL, W. A. Mechanisms in allergic airway inflammation - lessons from studies in the mouse. **Expert Rev Mol Med**, 10: e15, 2008.

SIDDIQUI, S., JO, T., TAMAOKA, M., SHALABY, K. H., GHEZZO, H., BERNABEU, M., MARTIN, J. G. Sites of allergic airway smooth muscle remodeling and hyperresponsiveness are not associated in the rat. **J Appl Physiol**, 109: 1170–1178, 2010.

SILVA, L. C. C; HETZEL, J. L. **Asma brônquica: manejo clínico.** 1ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

SINGH, R.K., GUPTA S., DASTIDAR, S., RAY, A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. **Pharmacology**, 85: 336–349, 2010.

SOLWAY, J., FREDBERG, J. J. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyperresponsiveness after all. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 17: 144–146, 1997.

STANKOVA, J., TURCOTTE, S., HARRIS, J., ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Modulation of leukotriene B<sub>4</sub> receptor-1 expression by dexamethasone: potential mechanism for enhanced neutrophil survival. **J Immunol**, 168(7): 3570-3576, 2002.

THIEN, F. C. K., WOODS, R., DE LUCA, S., ABRAMSON, M. J. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children. **Cochrane Database Syst Rev**, 2 CD001283, 2002.

TIAN, L., LI, W., WANG, J., ZHANG, Y., ZHENG, Y., QI, H., GUO, X., ZHANG, Y., MA, D., SHEN, H., WANG, Y. The CKLF1-C19 peptide attenuates allergic lung inflammation by inhibiting CCR3- and CCR4-mediated chemotaxis in a mouse model of asthma. **Allergy**, 66: 287–297, 2011.

TILLEY, S. L., HARTNEY, J. M., ERIKSON C. J., JANIA, C., NGUYEN, M., STOCK, J., MCNEISCH, J., VALANCIUS, C., PANETTIERI, R. A. JR, PENN, R. B., KOLLER, B. H. Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on airway tone. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 284(4): L599-L606, 2003.

TLIBA, O., AMRANI, Y., PANETTIERI Jr, R. A. Is airway smooth muscle the “missinglink” modulating airway inflammation in asthma? **Chest**, 133: 236–242, 2008.

TODO-BOM, A., PINTO, A. M. Fisiopatologia da asma grave. **Rev Bras Alergia Immunopatol**, 29(3), 2006.

TOWNLEY, R. G., HORIBA, M. Airway hyperresponsiveness: a story of mice and men and cytokines. **Clin Rev Allergy Immunol**, 24(1): 85-110, 2003.

TRIFILIEFF, A., WALKER, C., KELLER, T., KOTTIRSCH, G., NEUMANN, U. Pharmacological profile of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF- $\alpha$  converting enzyme and matrix metalloproteinases in models of airway inflammation. **Br J Pharmacol**, 135: 1655–1664, 2002.

TULL, S. P., YATES, C. M., MASKREY, B. H., O'DONNELL, V. B., MADDEN, J., GRIMBLE, R. F., CALDER, P. C., NASH, G. B., RAINGER, G. E. Omega-3 fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biol**, 7:e1000177, 2009.

UMETSU, D. T., MCINTIRE, J. J., AKBARI, O., MACAUBAS, C., DEKRUYFF, R. H. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nat Immunol**, 3: 715–720, 2002.

VACHIER, I., BONNANS, C., CHAVIS, C., FARCE, M., GODARD, P., BOUSQUET, J., CHANEZ, P. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. **J Allergy Clin Immunol**, 115(1): 55-60, 2005.

VERBOUT, N. G., JACOBY, D. B., GLEICH, G. J., FRYER, A. D. Atropine-enhanced, antigen challenge-induced airway hyper-reactivity in guinea pigs is mediated by eosinophils and nerve growth factor. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 297: L228–L237, 2009.

VILLANI, A. M., CROTTY, M., CLELAND, L. G., JAMES, M. J., FRASER, R. J., COBIAC, L., MILLER, M. D. Fish oil administration in older adults: is there potential for adverse events? A systematic review of the literature. **BMC Geriatrics**, 13: 41, 2013.

VOYNOW, J.A., KUMMARAPURUGU, A. Isoprostanes and asthma. **Biochim Biophys Acta**, 1810: 1091–1095, 2011.

WADA, M., DELONG, C. J., HONG, Y. H., RIEKE, C. J., SONG, I., SIDHU, R. S., YUAN, C., WARNOCK, M., SCHMAIER, A. H., YOKOYAMA, C., SMYTH, E. M., WILSON, S. J., FITZGERALD, G. A., GARAVITO, R. M., SUI, X., REGAN, J. W., SMITH, W. L. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. **J Biol Chem**, 282(31): 22254–22266, 2007.

WAHL, S.M.; VÁZQUEZ, N.; CHEN, W. Regulatory T cells and transcription factors: gate keepers in allergic inflammation. **Cur Op Immunology**, 16: 768–774, 2004.

WANG, I. Y., BAI, Y., SANDERSON, M. J., SNEYD, J. A mathematical analysis of agonist- and KCl-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in mouse airway smooth muscle cells. **Biophys J**, 98(7): 1170–1181, 2010.

WARD, C., JOHNS, D. P., BISH, R., PAIS, M., REID, D. W., INGRAM, C., FELTIS, B., WALTERS, E. H. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, 164(9): 1718–1721, 2001.

WARDLAW, A. J. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: a multistep paradigm. **J Allergy Clin Immunol**, 104: 917–926, 1999.

WATANABE, S., YAMASAKI, A., HASHIMOTO, K., SHIGEOKA, Y., CHIKUMI, H., HASEGAWA, Y., SUMIKAWA, T., TAKATA, M., OKAZAKI, R., WATANABE, M., YOKOGAWA, T., YAMAMURA, M., HAYABUCHI, T., GERTHOFFER, W. T., HALAYKO, A. J., SHIMIZU, E. Expression of functional leukotriene  $\text{B}_4$  receptors on human airway smooth muscle cells. **J Allergy Clin Immunol**, 124: 59–65, 2009.

WATSON, N., MAGNUSSEN, H., RABE, K. Inherent tone of human bronchus: role of eicosanoids and the epithelium. **Br J Pharmacol**, 121: 1099–1104, 1997.

WEYLANDT, K. H., CHIU, C-Y., GOMOLKA, B., WAECHTER, S. F., WIEDENMANN, B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: towards an understanding of resolvins and protectins formation Omega-3 fatty acids and their resolvins/protectins mediators. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, 97(3–4): 73–82, 2012.

WIGGS, B. R., BOSKEN, C., PARE, P. D., JAMES, A., HOGG, J. C. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. **Am Rev Respir Dis**, 145: 1251–1258, 1992.

- WIGGS, B. R., HROUSIS, C. A., DRAZEN, J. M., KAMM, R. D. On the mechanism of mucosal folding in normal and asthmatic airways. **J Appl Physiol**, 83: 1814 –1821, 1997.
- WILLS-KARP, M., LUYIMBAZI, J., XU, X., SCHOFIELD, B., NEBEN, T. Y., KARP, C. L., DONALDSON, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, 282 (5397): 2258-2261, 1998.
- WOOD, L. G.; GARG, M. L.; BLAKE, R. J.; GARCIA-CARABALLO, S.; GIBSON, P. G. Airway and circulating levels of carotenoids in asthma and healthy controls. **J Am Coll Nutr**, 24: 448-455, 2005.
- WOODS, R. K., RAVEN, J. M., WALTERS, E. H., ABRAMSON, M. J., THIEN, F. C. K. Fatty acid levels and risk of asthma in young adults. **Thorax**, 59: 105–110, 2004.
- YAMAGUCHI, A. A. **Ácido graxo  $\alpha$ -linolênico e seus metabólitos, ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), em células do tumor de Walker 256. Há equivalência nas suas ações?** 2012. 69 f. Dissertação de Mestrado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- YAN, D., STOCCO, R., SAWYER, N., NESHEIM, M. E., ABRAMOVITZ, M., FUNK, C. D. Differential signaling of cysteinyl leukotrienes and a novel cysteinyl leukotriene receptor-2 (CysLT2) agonist, N-Methyl-Leukotriene C4, in calcium reporter and  $\beta$  arrestin assays. **Mol Pharmacol**, 79(2): 270-278, 2011.
- YANG, L., COHN, L., ZHANG, D. H., HOMER, R., RAY, A., RAY, P. Essential role of nuclear factor  $\kappa$ B in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. **J Exp Med**, 188: 1739–1750, 1998.
- YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **Br J Nutr**, 1: 41-45, 2007.
- YIM, P. D., GALLOS, G., XU, D., ZHANG, Y., EMALA, C. W. Novel expression of a functional glycine receptor chloride channel that attenuates contraction in airway smooth muscle. **FASEB J**, 25: 1706–1717, 2011.
- YIN, H.; LIU, W.; GOLENIEWSKA, K.; PORTER, N. A.; MORROW, J. D.; PEEBLES Jr, R. S. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid-containing fish oil suppresses F<sub>2</sub>-isoprostanes but enhances inflammatory cytokine response in a mouse model of ovalbumin-induced allergic lung inflammation. **Free Radic Biol Med**, 47: 622-628, 2009.
- YOSHIFUKU, K., MATSUNE, S., OHORI, J., SAGARA, Y., FUKUIWA, T., KURONO, Y. IL-4 and TNF-alpha increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration. **Rhinology**, 45: 235–241, 2007.
- ZHANG, Y., XU, C. B., CARDELL, L. O. Long-term exposure to IL- 1 $\beta$  enhances TOLL-IL-1 receptor-mediated inflammatory signaling in murine airway hyperresponsiveness. **Eur Cytokine Netw**, 20: 148–156, 2009.
- ZHOU, W., NEWCOMB, D. C., MOORE, M. L., GOLENIEWSKA, K., O'NEAL, J. F., PEEBLES Jr, R. S. Cyclooxygenase inhibition during allergic sensitization increases

STAT6-independent primary and memory Th<sub>2</sub> responses. **J Immunol**, 181: 5360–5367, 2008.

## ANEXOS

## ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 468

## CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.029677/2010-31

APROVADO: 17/08/2010 – R.O. 07/2010

**TÍTULO:** Efeito da suplementação da dieta com óleo de peixe e vitamina E sobre a funcionalidade de macrófagos alveolares e produção de PAF e PAF-like no pulmão de ratos Wistar asmáticos

**AUTORES:** Anita Nishiyama, Dalva Teresinha da Souza Zardo Miranda, Fabiola Guerra Persson, Vanessa Rodrigues de Souza, Mayra Bruna Fedalto

DEPARTAMENTO: Fisiologia

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador do CEEA